ソホスブビル／ベルパタスビル

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.4 薬物動態試験の概要文

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁
略号一覧表 6
薬物動態に関する用語 8
1 まとめ 9
1.1 ベルパタスビル 9
1.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 11
2 分析法 13
2.1 ベルパタスビル 13
2.1.1 生体試料中薬物濃度分析法 13
2.1.1.1 薬物動態試験で使用した生体試料中薬物濃度分析法 13
2.1.1.2 GLP 適合トキシコキネティクス試験で使用した生体試料中薬物濃度分析法 13
2.1.2 *In vitro* 試験での分析法 13
2.1.2.1 安定性 13
2.1.2.2 血漿タンパク結合 13
2.1.2.3 UGT1A1 及び CYP に対する阻害 14
2.1.2.4 誘導の可能性 14
2.1.2.5 トランスポーターとの相互作用 15
2.1.3 放射化学的分析法 15
2.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 16
2.2.1 *In vitro* 試験 16
2.2.1.1 *In vitro* 吸収 16
2.2.1.2 細胞内代謝 16
3 吸収 17
3.1 ベルパタスビル 17
3.1.1 単回投与 17
3.1.1.1 ラット、ウサギ、イヌ及びサルにベルパタスビルを単回静脈内投与したときの PK プロファイル 17
3.1.1.2 マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルにベルパタスビルを単回経口投与したときの PK プロファイル 17
3.1.2 反復投与 20
3.1.3 投与媒体の検討 20
3.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 21
3.2.1 *In vitro* 吸収試験 21
4 分布 22
4.1 ベルパタスビル 22
4.1.1 *In vitro* タンパク結合率 22
4.1.1.1 ベルパタスビルのマウス、ラット、イヌ、サル及びヒト血漿タンパク結

合率 22
4.1.1.2 CCM 中ベルパタスビルの血漿中ベルパタスビルに対する相対タンパク結合率 22
4.1.2 組織内分布試験 23
4.1.2.1 CD-1 マウス及び rasH2 マウスにおける組織内分布 23
4.1.2.2 Sprague-Dawley ラット及び Long Evans ラットにおける組織内分布 23
4.1.2.3 妊娠及び授乳 Sprague-Dawley ラットにおける組織内分布 26
4.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 27
5 代謝（動物種間の比較） 28
5.1 ベルパタスビル 28
5.1.1 *In vitro* 代謝 28
5.1.2 *In vivo* 代謝物の同定 29
5.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 32
6 排泄 33
6.1 ベルパタスビル 33
6.1.1 BDC 未処置マウス、ラット及びイヌ並びに BDC 処置ラット及びイヌにおける排泄 33
6.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 33
7 薬物動態学的薬物相互作用 34
7.1 ソホスブビル 34
7.1.1 CYP に対する阻害作用 34
7.1.2 カルボキシルエステラーゼとの相互作用 34
7.1.3 トランスポーターとの相互作用 35
7.2 ベルパタスビル 35
7.2.1 CYP 及び UGT1A1 に対する阻害作用 35
7.2.2 誘導作用 36
7.2.3 トランスポーターとの相互作用 38
7.3 ソホスブビル／ベルパタスビル 40
7.3.1 CYP 及び UGT1A1 に対する阻害 40
7.3.2 細胞内活性化 40
7.3.3 誘導作用 40
7.3.4 トランスポーターとの相互作用 41
8 その他の薬物動態試験 42
9 考察及び結論 43
9.1 ベルパタスビル 43
9.2 ソホスブビル／ベルパタスビル 44
10 図表 46

表目次

頁

表 1　ラット、ウサギ、イヌ及びサルにベルパタスビルを静脈内投与したとき（30 分間インフュージョン）の血漿中 PK パラメーター....17
表 2　Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬及びカニクイザルにベルパタスビルを経口投与したときの血漿中 PK パラメーター....18
表 3　CD-1 マウスにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したときの血漿中 PK パラメーター....19
表 4　1178-W マウスにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与後したときの血漿中 PK パラメーター....19
表 5　ラットにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したときの血漿中 PK パラメーター....19
表 6　雌 NZW ウサギにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したときの血漿中 PK パラメーター....20
表 7　ビーグル犬にベルパタスビルを用量漸増単回経口投与後の血漿中 PK パラメーター....20
表 8　各動物種でのベルパタスビルの血漿タンパク結合率....22
表 9　雄 Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを 30 mg/kg で単回経口投与したときの血液及び組織内放射能濃度....24
表 10　肝ミクロソームでのベルパタスビルの代謝....28
表 11　ベルパタスビル及び陽性対照のヒト主要 CYP での代謝（min^{-1}）....29
表 12　[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの血漿中主要代謝物（総血漿中 AUC に対する割合）....30
表 13　[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの胆汁及び糞中の主要代謝物....31
表 14　HCV 患者の定常状態でのソホスブビル、GS-331007 及びベルパタスビルの PK パラメーター....34
表 15　ベルパタスビル及び典型的阻害剤の主要なヒト CYP に対する IC_{50} 値....35
表 16　ベルパタスビル又は陽性対照によるヒト AhR 及び PXR の活性化....37
表 17　ヒト培養肝細胞でのベルパタスビルの CYP 活性に対する影響....38
表 18　ヒト培養肝細胞でのベルパタスビルの mRNA 発現量に対する影響....38
表 19　ベルパタスビルによるトランスポーターの阻害....40

図目次

頁

図 1　吸収、組織内分布、代謝及び排泄試験に使用した[^{14}C]ベルパタスビルの構造式.....16
図 2　雄 Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビル（30 mg/kg、100 μCi/kg）を単回経口投与したときの投与 4 時間後の全身オートラジオグラム（動物：B33423）.....26
図 3　[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの血漿、尿、胆汁及び糞中で同定された代謝物に基づくベルパタスビルの推定代謝経路.....32

略号一覧表

略号	英語	日本語
AhR	aryl hydrocarbon receptor	芳香族炭化水素受容体
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
BDC	bile duct-cannulated	胆管カニューレ
BLQ	below limit of quantification	定量下限未満
BSEP	bile salt export pump	－
Caco-2	human colonic adenocarcinoma cell line	ヒト結腸癌由来の細胞株
CAR	constitutive androstane receptor	恒常的活性化アンドロスタン受容体
CCM	cell culture medium	細胞培養培地
cDNA	complementary DNA	相補的デオキシリボ核酸
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CsA	cyclosporine A	シクロスポリン A
CYP	cytochrome P450	シトクロム P450
EC_{50}	half-maximal effective concentration	50%効果濃度
GI	gastrointestinal	消化管
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GS-5816	Velpatasvir	ベルパタスビル
GS-331007	metabolite of sofosbuvir; nucleoside analog	ソホスブビルの代謝物；ヌクレオシド誘導体
GS-461203	pharmacologically active metabolite of sofosbuvir; nucleoside analog triphosphate	ソホスブビルの活性代謝物；ヌクレオシド誘導体三リン酸
HCV	hepatitis C virus	C 型肝炎ウイルス
HEK293	human Embryonic Kidney cells 293	ヒト胎児腎細胞 293
IC_{50}	concentration resulting in 50% inhibition	50%阻害濃度
LC-MS/MS	high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー
MATE	multidrug and toxin transporter	－
MDCKII	Madin-Darby canine kidney strain II	イヌ腎臓尿細管上皮細胞 II
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRP	multidrug resistance related protein	多剤耐性関連蛋白質
N	number	－

略号一覧表（続き）

略号	英語	日本語
NA	not applicable	該当なし
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
ND	not determined/not detectable	検出できず
NS	nonstructural protein	非構造タンパク質
NTCP	Na^+ taurocholate cotransporting polypeptide	Na^+タウロコール酸共輸送ポリペプチド
NZW	New Zealand white	ニュージーランド白色
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	－
OCT	organic cation transporter	－
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核球
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PXR	pregnane X receptor	プレグナン X 受容体
RFD	radio flow through detector	ラジオフロー検出器
SD	standard deviation	標準偏差
Sf9	S. frugiperda	－
SIF	simulate intestinal fluid	人工腸液
UDPGA	uridine 5’ diphosphate glucuronic acid	ウリジン 5'-二リン酸-グルクロン酸
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase	ウリジン 5'-二リン酸-グルクロン酸転移酵素
WT	wild type	野生型

薬物動態に関する用語

略号	英語	日本語
AUC	the area under the concentration versus time curve	濃度－時間曲線下面積
$AUC_{(0\text{-}24h)}$	the area under the concentration versus time curve from time zero to time 24	0 時間から 24 時間までの濃度－時間曲線下面積
$AUC_{(0\text{-}\infty)}$	the area under the concentration versus time curve from time zero to infinity	0 時間から無限大まで外挿した濃度－時間曲線下面積
C_{max}	the maximum observed concentration of drug	最高濃度
CL	clearance	クリアランス
F	estimated oral bioavailability of the drug (%), calculated as 100 × (AUC_{PO} × $Dose_{IV}$) / (AUC_{IV} × $Dose_{PO}$)	絶対的経口バイオアベイラビリティ
F_a	fraction of the administered dose absorbed into the enterocytes from the intestinal lumen	小腸上皮細胞膜透過率
F_g	fraction of the administered dose that survives the presystemic intestinal elimination	小腸上皮細胞での代謝をまぬがれる割合
Ka	rate constant for oral drug absorption	吸収速度定数
MRT	mean residence time	平均滞留時間
Qh	hepatic blood flow rate	肝血流速度
$t_{1/2}$	estimate of the terminal elimination half-life of the drug in serum/plasma/PBMC, calculated by dividing the natural log of 2 by the terminal elimination rate constant (λz)	消失半減期
T_{max}	time to maximal concentration	最高濃度到達時間
V_{ss}	volume of distribution at steady state	分布容積

ベルパタスビルの換算係数は以下を使用した:
ベルパタスビル（GS-5816）: 1 μmol/L = 0.883 μg/mL

1　まとめ

本剤はソホスブビル及びベルパタスビル（GS-5816）を有効成分として含有する配合錠であり、本申請資料は慢性 C 型肝炎ウイルス（HCV）感染症の治療に対する本剤の製造販売承認申請の根拠として提出する。

ソホスブビルは、ソバルディ®錠 400mg として平成 27 年 3 月 26 日に国内で承認された。また、平成 29 年 3 月 24 日に効能追加に係る一部変更承認申請（以下、「一変申請」）が承認された。

レジパスビル／ソホスブビル配合剤は、ハーボニー®配合錠（レジパスビル 90 mg 及びソホスブビル 400 mg）として平成 27 年 7 月 3 日に国内で承認された。また、平成 30 年 2 月 16 日に効能追加に係る一変申請が承認された。

ソホスブビルの非臨床薬物動態（PK）試験データは、ソバルディ®錠及びハーボニー®配合錠の承認及び一変申請時に提出済みであり、CTD 2.4 及び CTD 2.6.4 に要約した。本申請資料では、ソホスブビル、ベルパタスビル、ソホスブビルとベルパタスビル併用及び本剤を用いた新規の非臨床試験については詳述し、関連する既提出のソホスブビル非臨床試験については必要に応じて再提出する。

ベルパタスビルの包括的な非臨床 PK 試験は単剤で実施した。予備試験、探索的試験及び作用機序を検討する試験は、適切な試験計画書及び文書に従って実施することでデータの信頼性を確保した。

非臨床 PK 試験から得られた処方医師に提供すべきと考えられる全ての情報は添付文書案に含まれる。概して、ソホスブビル及びベルパタスビルの非臨床 PK 試験結果から、HCV の治療に対する両薬剤を併用することの有用性が裏付けられた。

1.1　ベルパタスビル

ベルパタスビルは HCV の非構造タンパク質（NS）5A に対する強力な阻害剤である。非臨床での動物種におけるベルパタスビルの絶対的経口バイオアベイラビリティ（F）は中程度で、ラット、イヌ及びサルにおいて 25%～30%であり、高用量では吸収飽和が認められた。ベルパタスビルは検討した全ての動物種で高い血漿タンパク結合率（99.5%超）を示し、その分布は良好で、分布容積（V_{ss}）はラット、イヌ及びサルにおいて 1.5～1.6 L/kg の範囲であった。マウス及びラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したとき、放射能はほぼ全ての組織、特に肝臓に速やかに分布した。ベルパタスビルはメラニンと結合する可能性が示唆されたが、有色皮膚からの消失は速やかであった。妊娠ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したとき、放射能は胎盤を通過せず、胎児の血液及び全身に放射能は検出されなかった。授乳ラットにおける[^{14}C]ベルパタスビル経口投与後の乳汁中放射能の最高濃度到達時間（T_{max}）は 4 時間であり、投与後 24 時間までに放射能は検出されなくなった。

ベルパタスビルはシトクロム P450（CYP）2B6、CYP2C8 及び CYP3A4 の基質である。マウス、ラット、イヌ及びヒトにおけるベルパタスビルの主要な代謝反応は酸化及び *O*-脱メチル化である。マウス、ラット及びイヌにおいて、ベルパタスビルは未変化体及び代謝物として主に胆汁排泄により消失する。マウス、ラット及びイヌに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したとき、尿中に排泄された放射能はごくわずか（投与量の 0.27%未満）であった。ベルパタスビルの消失には CYP2B6、

CYP2C8 及び CYP3A4 が関与していることから、ベルパタスビルの全身曝露はこれらの酵素の誘導剤によって減少し、阻害剤によって上昇する可能性がある。

ベルパタスビルはプレグナン X 受容体（PXR）、恒常的活性化アンドロスタン受容体（CAR）又は芳香族炭化水素受容体（AhR）を介した臨床的に問題となる誘導剤ではないと考えられる。*In vitro* 試験ではレポーター細胞株において、50 µmol/L 以下の濃度で AhR を活性化せず、PXR をわずかに活性化した。さらに、ヒト培養肝細胞においてベルパタスビルは 10 µmol/L 以下の濃度で、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の活性並びに CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、CYP2C9、P 糖蛋白質（P-gp）又は UDP グルクロン酸転移酵素（UGT）1A1 のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）発現量の用量依存的誘導を示さなかった。

また、ベルパタスビルは主要なヒト代謝酵素 CYP の阻害剤ではない。ベルパタスビルはヒト肝ミクロソーム画分中、25 µmol/L 以下の濃度で、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4 を阻害しなかった。従って、ベルパタスビルが CYP を阻害又は誘導することによって薬物相互作用を生じる可能性は低いと考えられる。ベルパタスビルは、*in vitro* 試験において UGT1A1 に対して IC_{50}（50%阻害濃度）値 1.56 µmol/L の阻害作用を示すが、臨床用量での最高血漿中濃度が低いこと（最高濃度［C_{max}］ = 259 ng/mL、すなわち 0.293 µmol/L）及びベルパタスビルの血漿タンパク結合率が高いことから、ベルパタスビルが UGT1A1 の基質と相互作用する可能性は低いと考えられる。

ベルパタスビルは P-gp 及び乳癌耐性タンパク質（BCRP）の基質であり、その消化管（GI）吸収は P-gp 及び BCRP の誘導剤との併用によって減少し、それらの阻害剤との併用で上昇する可能性がある。臨床試験では、ベルパタスビルは肝臓に発現する取り込みトランスポーターである organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 及び／又は OATP1B3 の弱い基質であることが示唆されている。*In vitro* 試験で organic cation transporter（OCT1）の基質であるというエビデンスは認められなかった。ベルパタスビルは *in vitro* 試験で多くのトランスポーターの阻害剤であったが、臨床用量での最高血漿中濃度が低く（C_{max}= 259 ng/mL、すなわち 0.293 µmol/L）、また高いタンパク結合率により循環血中の非結合型薬物濃度が低くなることから、GI 外でのベルパタスビルによるトランスポーターを介した阻害の可能性は低い。ベルパタスビルは排出トランスポーターである P-gp、BCRP 及び bile salt export pump（BSEP）に対して用量依存的阻害を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 20.6 µmol/L、0.30 µmol/L 及び 0.64 µmol/L であった。ベルパタスビルは OATP1B1 及び OATP1B3 の阻害剤であり、その IC_{50} 値はそれぞれ 1.5 µmol/L 及び 0.26 µmol/L である。スタチン（プラバスタチン及びロスバスタチン）を用いた臨床試験では、初回通過過程でこれらトランスポーターに対する弱い阻害作用が示唆された。*In vitro* 試験では、検討した最高濃度（10 µmol/L）で OATP2B1 に対する弱い阻害（30%）が認められ、GI における OATP2B1 阻害の可能性が示唆された。ベルパタスビルは多剤耐性関連蛋白質（MRP）2、Na^+タウロコール酸共輸送ポリペプチド（NTCP）、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3 及び OATP1A2 を阻害せず、これらトランスポーターについて臨床的に意義のある阻害剤ではないと考えられた。臨床薬物相互作用試験の結果（2.7.2.2.5.2.1 項；GS-US-281-0115）と一致して、ベルパタスビルのトランスポーターを介した阻害作用による薬物間相互作用の可能性は主に初回通過過程に限定される。ベルパタスビル投与後の GI 内濃度は P-gp 及び BCRP を阻害する濃度に達することから、これらトランスポーターの基質を併用投与した場合に、GI での吸収を高める可能性がある。

1.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

ソホスブビル及びベルパタスビルはGI内で被相互作用薬（victim）とも相互作用薬（perpetrator）ともなりうる。ソホスブビル及びベルパタスビルはいずれもP-gp及びBCRPの基質であり、それらの吸収はP-gp及びBCRPの阻害剤との併用で上昇し、誘導剤との併用で減少すると考えられる。ソホスブビル及びその主要代謝物であるGS-331007はP-gp及びBCRPの阻害剤ではないが、ベルパタスビルは吸収過程で達しうるGI内濃度でP-gp（IC_{50}値= 20.6 µmol/L）及びBCRP（IC_{50}値= 0.30 µmol/L）を阻害する可能性がある。配合錠として投与した場合、ベルパタスビルによるGI内でのP-gp及びBCRPの阻害により、ソホスブビルの血漿中曝露が上昇すると考えられる。

ソホスブビル及びベルパタスビルは異なる代謝及び消失経路を示すため、併用投与した場合に、GIからの吸収後の肝臓又は全身循環中で互いの薬物動態（PK）プロファイルに影響を及ぼすことはない。ソホスブビルのタンパク結合率は比較的低く（ヒト血漿中で70%未満）、速やかな肝初回通過効果及び加水分解酵素による広範な代謝を受ける。その後、主に腎臓から脱リン酸化ヌクレオシド代謝物（GS-331007）として排泄される。一方、ベルパタスビルの血漿タンパク結合率は高く（検討した全ての動物種で99.5%超）、CYP2B6、CYP2C8及びCYP3A4の基質である。全身クリアランス（CL）は低く、未変化体並びに酸化及び*O*-脱メチル化による代謝物として主に胆汁中に排泄される。

ソホスブビルの細胞内活性化経路は、低親和性／高活性の加水分解酵素とヌクレオチドのリン酸化経路を介している。ヒト初代培養肝細胞を用いた*in vitro*試験の結果から、薬理活性を有する三リン酸塩代謝物であるGS-461203へのソホスブビルの細胞内活性化にベルパタスビルは影響を及ぼすことはないと考えられる。

ソホスブビル、その主要代謝物であるGS-331007及びベルパタスビルは臨床的に意義のあるCYPの阻害剤ではなく、また誘導剤でもない。ソホスブビルとベルパタスビルの併用により、CYPを介した薬物相互作用を引き起こす可能性は低い。しかし、ベルパタスビルがCYPを介した代謝を受けることから、ベルパタスビルの曝露量はCYPの誘導剤との併用で減少し、阻害剤との併用で上昇する可能性がある。

ソホスブビル及びその主要代謝物はUGT1A1の臨床的に意義のある阻害剤ではない。ベルパタスビルはUGT1A1に対してIC_{50}値1.56 µmol/Lで用量依存的阻害作用を示すが、臨床でのベルパタスビルの血漿中濃度が低いこと及びベルパタスビルの血漿タンパク結合率が高いことから、ベルパタスビルによるUGT1A1阻害を介した薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。

ソホスブビルはOATP1B1、OATP1B3又はOCT1の基質ではない。臨床試験ではベルパタスビルがOATP1B1及びOATP1B3の弱い基質である可能性が示唆されているものの（2.7.2.2.5.2.1項；GS-US-281-0115）、*in vitro*試験において、ベルパタスビルの肝取り込みにOATP1B1、OATP1B3又はOCT1が関与するという明白なエビデンスはなかった。ソホスブビル及びその主要代謝物であるGS-331007は、臨床での血中濃度で、肝臓に発現するトランスポーターであるOCT1、OATP1B1、OATP1B3、MRP2又はBSEPに対する阻害作用を示さなかった。ベルパタスビルは肝トランスポーターであるMRP2、NTCP、OCT1、OATP1A2及びOATP2B1の臨床的に意義のある阻害剤ではない。ベルパタスビルはOATP1B1及びOATP1B3（IC_{50}値はそれぞれ1.5 µmol/L及び0.26 µmol/L）並びにBSEP（IC_{50}値は0.64 µmol/L）の阻害剤であることが明らかにされているが、タンパク結合率が高いこと、臨床での最高血漿中濃度が低いこと（C_{max} = 259 ng/mL、すなわち

0.293 μmol/L）、経口投与後の門脈中濃度が低いと推定されるために、ベルパタスビルによるこれらトランスポーター阻害を介した臨床上問題となる薬物相互作用は生じないと考えられる。ソホスブビル、その主要代謝物である GS-331007 及びベルパタスビルは、臨床における血漿中濃度で腎トランスポーターである OCT2、OAT1、OAT3 及び multidrug and toxin transporter（MATE）1 を阻害する可能性を示さなかった。糸球体ろ過と尿細管分泌によって腎臓から排泄される GS-331007 は薬物相互作用に関与する腎トランスポーターの基質ではない。

2 分析法

2.1 ベルパタスビル

2.1.1 生体試料中薬物濃度分析法

2.1.1.1 薬物動態試験で使用した生体試料中薬物濃度分析法

CD-1 マウス、Sprague-Dawley ラット、ニュージーランド白色（NZW）ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルの PK 試験で得られた血漿、胆汁及び尿試料中のベルパタスビル濃度を液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（LC-MS/MS）法で測定した（2.6.5.3 項；AD-281-2028、AD-281-2034、AD-281-2002、AD-281-2014、AD-281-2020、AD-281-2032、AD-281-2035、AD-281-2036、AD-281-2003、AD-281-2013、AD-281-2004、2.6.5.5.4 項；AD-281-2038 及び 2.6.5.13.4 項；AD-281-2005）。これらの試験で用いられた分析法は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）条件下でのバリデーション試験が実施されなかったが、分析単位内真度及び精度のほか選択性、感度及び直線性が適切に評価された。

2.1.1.2 GLP 適合トキシコキネティクス試験で使用した生体試料中薬物濃度分析法

毒性試験では、バリデートされた LC/MS/MS 法を用いて血漿中ベルパタスビル濃度を定量した。マウス、ラット、ウサギ及びイヌにおける毒性試験を裏付けるために分析法を開発した（2.6.5.2 項；BA-281-2007、BA-281-2002、BA-281-2004 及び BA-281-2003）。バリデーション項目は選択性、感度、直線性、回収率、キャリーオーバー、分析単位内及び分析単位間精度並びに真度、試料採取時の安定性、原液の安定性、注入媒体の妥当性、短期安定性、凍結融解安定性、長期安定性及び希釈再現性、再注入の再現性などであった。ラット及びイヌの毒性試験で得られた試料を用いて Incurred Sample Reproducibility analysis を実施し、分析法の再現性を確認した。

2.1.2 *In vitro* 試験での分析法

2.1.2.1 安定性

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトプール肝ミクロソーム並びにヒト凍結肝細胞を用いて、ベルパタスビルの肝代謝を *in vitro* 試験で評価した（2.6.5.9.1 項；AD-281-2039 及び 2.6.5.9.2 項；AD-281-2006）。

ヒト還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）CYP 還元酵素を共発現させた相補的デオキシリボ核酸（cDNA）発現ヒト CYP 発現系とベルパタスビルをインキュベートして、CYP 分子種の同定を行った（2.6.5.9.3 項；AD-281-2007）。CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 はヒトにおける主要な薬物代謝酵素である。なお、各 CYP で代謝されることが知られている薬物を対照として用いた。

2.1.2.2 血漿タンパク結合

ベルパタスビルの血漿タンパク結合率を、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト血漿を用いて、

ベルパタスビル 2 µmol/L（ヒト血漿では種々の濃度）、37°C 条件下で平衡透析法により評価した（2.6.5.6.1 項；AD-281-2037、2.6.5.6.2 項；AD-281-2001 及び 2.6.5.6.3 項；AD-281-2029）。10%ウシ胎児血清を含有する細胞培養培地（CCM）及びヒト血漿にベルパタスビルを最終濃度 2 µmol/L となるように添加し、これをセル間に半透膜を配置した透析セルの両側に置き、37°C による競合的な平衡透析法によりヒト血漿と CCM 間のベルパタスビルの相対タンパク結合率を評価した（2.6.5.6.2 項；AD-281-2001）。

2.1.2.3 UGT1A1 及び CYP に対する阻害

ベルパタスビルが UGT1A1 を阻害する可能性について、バキュロウイルス発現 UGT1A1 を含有する昆虫細胞ミクロソーム画分と共にインキュベートして評価した（2.6.5.12.2.2 項；AD-281-2016）。25 µg/mL アラメチシン及び 5 mmol/L ウリジン 5'-二リン酸グルクロン酸（UDPGA）の存在下、エストラジオール 10 µmol/L をベルパタスビルとインキュベートし、UGT1A1 選択的代謝物であるエストラジオール 3-グルクロニドの生成を LC-MS/MS で測定した。UGT1A1 の典型的基質であるエストラジオールの濃度はその K_m 値未満であった。溶媒対照と比較した代謝物生成の減少から、IC_{50} 値を算出した。

ベルパタスビルが CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 などの主要な CYP を阻害する可能性について、ヒト肝ミクロソーム画分での特異的基質での活性（エトキシレゾルフィン *O*-デエチラーゼ、ブプロピオン 4-ヒドロキシラーゼ、パクリタキセル 6α-ヒドロキシラーゼ、トルブタミド 4-ヒドロキシラーゼ、S-メフェニトイン 4'-ヒドロキシラーゼ、デキストロメトルファン *O*-デメチラーゼ、ミダゾラム 1'-ヒドロキシラーゼ及びテストステロン 6β-ヒドロキシラーゼ）を利用して評価した（2.6.5.12.2.1 項；AD-281-2008）。陽性対照阻害剤又は種々の濃度のベルパタスビルの存在下及び非存在下、ヒトプール肝ミクロソームと共に各酵素の典型的基質を個別にインキュベートした。酵素特異的代謝物の生成率を算出し、可能な場合は IC_{50} 値を求めた。

2.1.2.4 誘導の可能性

ベルパタスビルの AhR 及び PXR 活性化による代謝酵素誘導の可能性をレポーター細胞株で評価した（2.6.5.12.2.3 項；AD-281-2009）。ヒト PXR 発現ベクター及びルシフェラーゼ結合 CYP3A4 のエンハンサー領域を含むレポーター遺伝子ベクターで安定的に形質転換した DPX2 細胞を用いて PXR の活性化を評価した。ヒト AhR 発現ベクター及びルシフェラーゼレポーター結合ヒト CYP1A2 遺伝子のジオキシン応答エレメントで形質転換した DRE12.6 細胞を用いて AhR の活性化を評価した。ベルパタスビルの相対的な誘導能を評価するために、適切な対照薬物もベルパタスビルと共に評価した。対照薬物は CYP3A4 誘導にはリファンピシン、CYP1A 誘導には β-ナフトフラボンを用いた。

CYP、UGT1A1 及び P-gp に対するベルパタスビルの誘導作用を凍結肝細胞で評価した（2.6.5.12.2.4 項；AD-281-2025）。ドナー3 例から得た肝細胞を溶媒対照、適切な陽性対照又はベルパタスビルと共に計 3 日間、インキュベートした。陽性対照には、CYP1A2 に対してオメプラゾール、CYP2B6 及び P-gp に対してフェノバルビタール、CYP3A 及び CYP2C9 に対してリファンピシン並びに UGT1A1 に対して β-ナフトフラボンを用いた。各 CYP 分子種に特異的な *in situ* の酵素活性測定法によって CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A の誘導能を評価した。逆転写酵素ポリ

メラーゼ連鎖反応により、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、CYP2C9、UGT1A1 及び P-gp の mRNA 発現の誘導を評価した。誘導能評価での培養条件下におけるベルパタスビルの細胞毒性を MTT（3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド）アッセイを用いて評価し、処理期間後の相対細胞生存率を測定した。

2.1.2.5 トランスポーターとの相互作用

個々のトランスポーター発現チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を用いて、ベルパタスビルが OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質となる可能性について評価した（2.6.5.15.2.3 項；AD-281-2011 及び 2.6.5.15.2.7 項；AD-281-2026）。OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞におけるベルパタスビルの取り込み率を阻害物質であるリファンピシン（40 μmol/L）の存在下又は非存在下で算出し、野生型（WT）-CHO 細胞における取り込み率と比較した。OATP1B1 及び OATP1B3 の基質の陽性及び陰性対照としてアトロバスタチン及びアンチピリンを用いた。OCT1 発現 CHO 細胞でベルパタスビルの蓄積を測定し、WT-CHO 細胞での蓄積と比較した。

個々のトランスポーター遺伝子導入イヌ腎臓尿細管上皮細胞（MDCK）II 細胞において、[^{14}C]ベルパタスビルを用い、ベルパタスビルが P-gp 及び BCRP の基質となる可能性について評価した（2.6.5.15.2.4 項；AD-281-2041）。既知の P-gp 及び BCRP 阻害剤の存在下又は非存在下で、発現細胞中の[^{14}C]ベルパタスビルの蓄積を評価し、WT 細胞での蓄積と比較した。陽性対照としてプラゾシンを用いた。

個々のトランスポーター遺伝子発現細胞株又は膜ベシクルを用い、ベルパタスビルのトランスポーター阻害の可能性について評価した。OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OCT1、OCT2、MATE1 及び NTCP に対する阻害作用はこれらトランスポーターを発現した CHO 細胞を用いて検討した（2.6.5.15.2.1 項；AD-281-2010、2.6.5.15.2.5 項；AD-281-2012、2.6.5.15.2.6 項；AD-281-2026）。OATP1A2 に対する阻害作用は、OATP1A2 を発現したヒト胎児腎細胞 293（HEK293）を用いて検討した（2.6.5.15.2.2 項；AD-281-2040）。OAT3 に対する阻害作用は、OAT3 を発現した Flp-In293 細胞を用いて検討した（2.6.5.15.2.6 項；AD-281-2026）。P-gp、BCRP 及び OATP2B1 に対する阻害作用は、これらトランスポーターを発現した MDCKII 細胞を用いて検討した（2.6.5.15.2.1 項；AD-281-2010、2.6.5.15.2.2 項；AD-281-2040）。MRP2 及び BSEP に対する阻害作用は、MRP2 又は BSEP を発現させた S. frugiperda（Sf9）卵巣細胞の膜ベシクルを用いて検討した（2.6.5.15.2.5 項；AD-281-2012）。トランスポーター特異的な基質に対する輸送阻害については、ベルパタスビル濃度を漸増しながら評価した。いずれのアッセイも、各トランスポーター非発現細胞及び膜ベシクルに対する輸送活性並びに対照薬物による阻害などを含めた許容基準に適合した。

2.1.3 放射化学的分析法

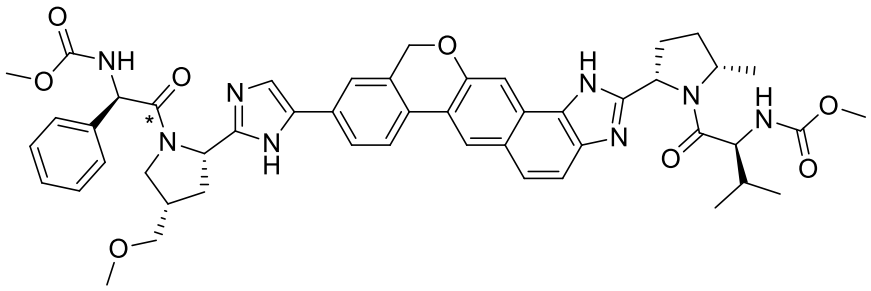
種々の動物種に[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与したときのベルパタスビルの吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。図 1 にベルパタスビルの[^{14}C]標識位置を示す。CD-1 マウス（2.6.5.5.1 項；AD-281-2021）並びに有色（Long-Evans）ラット及び白色（Sprague-Dawley）ラット（2.6.5.5.2 項及び 2.6.5.5.3 項；AD-281-2018）の定量的全身オートラジオグラフィーで、経口投与したときの組織内分布を評価した。[^{14}C]ベルパタスビルをマウス（2.6.5.5.1 項及び 2.6.5.13.1 項；AD-281-2021）、胆管カニューレ（BDC）処置及び未処置 Sprague-Dawley ラット（2.6.5.5.2 項及び 2.6.5.13.2 項；AD-281-2018）、Long-Evans ラット（2.6.5.5.3 項；AD-281-2018）並びに BDC 処置及

び未処置ビーグル犬（2.6.5.13.3 項；AD-281-2023）に経口投与したときの放射能の吸収及び排泄を評価するために、液体シンチレーションカウンターで測定した。

マウス、ラット及びイヌにおける[^{14}C]ベルパタスビル経口投与後の代謝物プロファイル及び同定はラジオフロー検出器（RFD）を備えた LC-MS 法にて評価した（2.6.5.10.1 項；AD-281-2022、2.6.5.10.3 項；AD-281-2019 及び 2.6.5.10.5 項；AD-281-2024）。逆相クロマトグラフィーでベルパタスビル及びその代謝物を分離し、RFD 及び質量分析計で同時に検出した。逆相クロマトグラフィーで得られた代謝物の保持時間はインライン計測による RFD によって得られたラジオクロマトグラム上のピークから算出し、代謝物の分子イオンは質量分析法によって、ラジオクロマトグラム上の代謝物の保持時間に対応するフルスキャン質量スペクトルから確認した。分子イオンの質量分析を行い、その質量スペクトルに基づいて代謝物の構造を同定した。可能な場合は、クロマトグラフィー及び質量スペクトルから、標準品と比較して代謝物の構造を確認した。

妊娠 Sprague-Dawley ラットにおける[^{14}C]ベルパタスビル単回経口投与後の放射能の胎盤及び乳汁移行を評価した（2.6.5.7.1 項；AD-281-2031）。妊娠ラットにおける投与後 24 時間までの特定の時点での組織中放射能濃度を全身オートラジオグラフィーで定量し、投与後 24 時間までの血液、血漿及び乳汁中放射能濃度を液体シンチレーションカウンターで測定した。

図 1　吸収、組織内分布、代謝及び排泄試験に使用した[^{14}C]ベルパタスビルの構造式



*[^{14}C]

2.2　ソホスブビル／ベルパタスビル

2.2.1　*In vitro* 試験

2.2.1.1　*In vitro* 吸収

ソホスブビルの双方向の膜透過性に対するベルパタスビルの影響についてヒト結腸癌由来の細胞株（Caco-2）の単層膜細胞を用いて評価した（2.6.5.15.1.1 項；AD-334-2002）

2.2.1.2　細胞内代謝

ソホスブビルの代謝に対するベルパタスビルの影響をヒト初代肝細胞で評価した（2.6.5.12.1.1 項；AD-334-2010）

3 吸収

3.1 ベルパタスビル

マウス、Sprague-Dawley ラット、NZW ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザルにベルパタスビルを静脈内及び経口投与したときの体内動態を評価した。また、Caco-2 単層膜細胞を用いてベルパタスビルの *in vitro* 透過性試験を行ったが、薬物の回収率が低く、再現性が乏しかったために信頼性のある値を得ることはできなかった.

3.1.1 単回投与

3.1.1.1 ラット、ウサギ、イヌ及びサルにベルパタスビルを単回静脈内投与したときの PK プロファイル

雄 Sprague Dawley ラット、雌 NZW ウサギ、雄ビーグル犬及び雄カニクイザルにベルパタスビルを単回静脈内投与したときの PK プロファイルを評価した（2.6.5.3.3 項 ; AD-281-2002、2.6.5.3.9 項 ; AD-281-2003、2.6.5.3.11 項 ; AD-281-2004 及び 2.6.5.5.4 項 ; AD-281-2038）。ベルパタスビルの血漿中 PK パラメーターを表 1 に示す。

全ての動物種（ラット、ウサギ、イヌ及びサル）でベルパタスビルの CL は低く、各動物種ともに肝血流量の 30%未満であった。これらの動物種におけるベルパタスビルの分布は良好で、V_{ss} は 1.5～1.6 L/kg であった。ラット、ウサギ、イヌ及びサルにおけるベルパタスビルの平均滞留時間（MRT）はそれぞれ約 1.7、3.6、5.7 及び 5.2 時間であった。消失半減期（$t_{1/2}$）はラットで約 2.4 時間、ウサギで 5.1 時間、イヌで 5.5 時間及びサルで 4.2 時間であった。

表 1 ラット、ウサギ、イヌ及びサルにベルパタスビルを静脈内投与したとき（30 分間インフュージョン）の血漿中 PK パラメーター

Species	$AUC_{(0-\infty)}$ (nmol/L•h)	CL (L/h/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{½}$ (h)	MRT (h)
Sprague-Dawley Rat	1320 ± 240	0.94 ± 0.19	1.61 ± 0.31	2.36 ± 0.26	1.72 ± 0.18
New Zealand White Rabbit	11800 ± 2560	0.44 ± 0.09	1.55 ± 0.22	5.05 ± 1.14	3.64 ± 0.78
Beagle Dog	1010 ± 187	0.25 ± 0.04	1.46 ± 0.43	5.51 ± 0.46	5.70 ± 0.70
Cynomolgus Monkey	2080 ± 705	0.30 ± 0.09	1.58 ± 0.62	4.18 ± 3.65	5.16 ± 1.21

Velpatasvir was dosed at 1 mg/kg to male Sprague-Dawley rats, 5 mg/kg to female NZW rabbits, 0.25 mg/kg to male beagle dogs and 0.5 mg/kg to male cynomolgus monkeys via a 30-min infusion.
Data presented as mean ± SD, n=3 for rat, dog and monkey, n=4 for rabbit
1 nmol/L Velpatasvir = 0.883 ng/mL
Source: AD-281-2002, AD-281-2003, AD-281-2004, and AD-281-2038

3.1.1.2 マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルにベルパタスビルを単回経口投与したときの PK プロファイル

雄 Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬及びカニクイザルにベルパタスビルを単回経口投与した

ときの PK プロファイルを評価した（2.6.5.3.3 項；AD-281-2002、2.6.5.3.9 項；AD-281-2003 及び 2.6.5.3.11 項；AD-281-2004）。ベルパタスビルの血漿中 PK パラメーターを表 2 に示す。経口投与後のベルパタスビルは速やかに吸収され、ラット、イヌ及びサルにおいてそれぞれ投与 1.0、1.3 及び 3.3 時間後に C_{max} に達した。これらの動物種におけるベルパタスビルの F は 25%～30%であり、検討した用量において溶液として投与した場合の吸収はさほど高くないことが示唆された。

表 2　Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬及びカニクイザルにベルパタスビルを経口投与したときの血漿中 PK パラメーター

Species	Dose (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (nmol/L)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{(0-\infty)}$ (nmol/L•h)	%F
Sprague-Dawley Rat	2.0	1.0 ± 0.0	116 ± 53	2.33 ± 0.38	709 ± 478	27.7 ± 18.7
Beagle Dog	0.5	1.3 ± 0.6	71.3 ± 27.2	9.14 ± 5.11	585 ± 343	25.0 ± 12.9
Cynomolgus Monkey	1.0	3.3 ± 1.2	157 ± 25	5.49 ± 0.20	1280 ± 123	29.7 ± 2.8

Formulation contained 5% ethanol, 55% polyethylene glycol 400 and 40% citrate buffer (pH 2.2).
Velpatasvir was dosed at 2 mg/kg to Sprague-Dawley rats, 0.5 mg/kg to beagle dogs and 1 mg/kg to cynomolgus monkeys.
Data presented as mean ± SD, n=3
1 nmol/L Velpatasvir = 0.883 ng/mL
Source: AD-281-2002, AD-281-2003 and AD-281-2004

雄 CD-1 マウス、雌雄 001178-W［野生型 CByB6F1-Tg（HRAS）2Jic］マウス（1178-W マウス）、雄 Sprague-Dawley ラット、雌 NZW ウサギ及び雄ビーグル犬にベルパタスビルを単回漸増経口投与したときの PK プロファイルを評価した（2.6.5.3.1 項；AD-281-2028、2.6.5.3.2 項；AD-281-2034、2.6.5.3.4 項；AD-281-2014、2.6.5.3.6 項；AD-281-2032 及び 2.6.5.3.10 項；AD-281-2013）。ベルパタスビルの血漿中 PK パラメーターを表 3、表 4、表 5、表 6 及び表 7 に示す。

雄 CD-1 マウスにベルパタスビル水性懸濁液を用量漸増単回経口投与したところ、ベルパタスビルの血漿中曝露量は 30～1000 mg/kg の用量範囲で増加した（表 3）。この用量範囲では、ベルパタスビル曝露量の増加率は用量比を下回った。雌雄 1178-W マウスにベルパタスビル水性懸濁液を用量漸増単回経口投与したところ、ベルパタスビルの血漿中曝露量は 100～1000 mg/kg の用量範囲で増加した（表 4）。この用量範囲では、ベルパタスビル曝露量の増加率は用量比を下回った。1178-W マウスにおいてベルパタスビルの血漿中曝露量に顕著な性差はみられなかった。ベルパタスビルの血漿中曝露量は CD-1 マウスと 1178-W マウスで類似していた。

雄 Sprague-Dawley ラットに有機溶媒ベースの溶媒を用いてベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したところ、ベルパタスビルの血漿中曝露量は 10～300 mg/kg の用量範囲で増加した（表 5）。曝露量の増加率は 10～150 mg/kg の用量範囲ではほぼ用量比例的であったが、150～300 mg/kg の用量範囲では用量比を下回った。また 600 mg/kg ではベルパタスビルの血漿中曝露量が低下し、ラットでは 300 mg/kg で吸収飽和に達したことが示唆された。

雌 NZW ウサギにベルパタスビル水性懸濁液を用量漸増単回経口投与したところ、ベルパタスビルの血漿中曝露量は 100～600 mg/kg の用量範囲で増加した（表 6）。ベルパタスビルの血漿中曝露量の増加率は 100～300 mg/kg の用量範囲では用量比を下回ったが、300～600 mg/kg では用量比を上回った。また、1000 mg/kg ではベルパタスビルの血漿中曝露量が低下し、NZW ウサギでは 600 mg/kg で吸収飽和に達したことが示唆された。

雄ビーグル犬に有機溶媒ベースの溶媒を用いてベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したところ、ベルパタスビルの血漿中曝露量は 3～100 mg/kg の用量範囲で増加した（表 7）。イヌにおけるベルパタスビルの血漿中曝露量の増加率は 3～30 mg/kg の用量範囲ではほぼ用量比例的であったが、30～100 mg/kg までは用量比を下回った。また、200 mg/kg ではベルパタスビルの血漿中曝露量が低下し、ビーグル犬では 100 mg/kg で吸収飽和に達したことが示唆された。

表 3　CD-1 マウスにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したときの血漿中 PK パラメーター

Dose (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µg·h/mL)
30	3.0	4.01	37.1
100	4.0	7.43	81.7
300	4.0	10.5	176
1000	8.0	17.4	249

Formulation contained 0.2% Tween 20, 0.2% hydroxyl propyl methylcellulose and 99.6% (w/w) water.
PK parameters are calculated from the mean concentrations from 3 mice at each time point.
1 ng/mL Velpatasvir = 1.13 nmol/L
Source: AD-281-2028

表 4　1178-W マウスにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与後したときの血漿中 PK パラメーター

	T_{max} (h)		C_{max} (µg/mL)		$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µg·h/mL)	
Dose (mg/kg)	Male	Female	Male	Female	Male	Female
100	4.0	4.0	8.57	11.5	107	112
300	4.0	8.0	9.96	11.1	156	180
1000	12	12	14.0	17.2	223	266

Formulation contained 0.2% Tween 20, 0.2% hydroxyl propyl methylcellulose and 99.6% (w/w) water.
PK parameters are calculated from the mean concentrations from 3 mice at each time point.
1 ng/mL Velpatasvir = 1.13 nmol/L
Source: AD-281-2034

表 5　ラットにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したときの血漿中 PK パラメーター

Dose (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µg·h/mL)
10	2.7 ± 1.2	0.19 ± 0.04	1.46 ± 0.11
30	4.0 ± 0.0	0.51 ± 0.11	5.68 ± 1.46
75	4.0 ± 0.0	1.00 ± 0.31	9.54 ± 0.96
150	6.0 ± 0.0	1.31 ± 0.06	17.0 ± 2.2
300	10.0 ± 3.5	1.62 ± 0.57	24.1 ± 8.2
600	10.7 ± 2.3	1.25 ± 0.23	18.7 ± 1.8

Formulation contained 45% propylene glycol, 15% Solutol HS-15 and 40% water (pH adjusted to 2.0 with HCl).
Data presented as mean ± SD, n=3
1 ng/mL Velpatasvir = 1.13 nmol/L
Source: AD-281-2014

表 6　雌 NZW ウサギにベルパタスビルを用量漸増単回経口投与したときの血漿中 PK パラメーター

Dose (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µg·h/mL)
100	2.7 ± 1.2	0.133 ± 0.034	0.710 ± 0.216
300	4.0 ± 2.0	0.115 ± 0.040	0.980 ± 0.305
600	8.0 ± NC	0.225 ± NC	2.87 ± NC
1000	6.7 ± 5.0	0.134 ± 0.050	2.08 ± 0.93

Formulation contained 0.5% hydroxyl propyl methylcellulose, 0.1% Tween 20, 0.9% benzyl alcohol, and 98.5% (w/w) water.
Data presented as mean ± SD, n=3
1 ng/mL Velpatasvir = 1.13 nmol/L
NC = Not calculated due to insufficient data
Source: AD-281-2032

表 7　ビーグル犬にベルパタスビルを用量漸増単回経口投与後の血漿中 PK パラメーター

Dose (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µg·h/mL)
3	3.33 ± 1.15	0.255 ± 0.155	1.45 ± 0.80
10	2.00 ± 0.00	0.394 ± 0.146	2.20 ± 0.36
30	10.0 ± 12.2	0.974 ± 0.162	10.3 ± 1.2
100	6.67 ± 4.62	1.24 ± 0.13	14.8 ± 1.4
200	10.7 ± 11.5	1.14 ± 0.51	8.65 ± 1.49

Formulation contained 45% propylene glycol, 15% Solutol HS-15 and 40% water (pH adjusted to 2 with HCl).
Data presented as mean ± SD, n=3
1 ng/mL Velpatasvir = 1.13 nmol/L
Source: AD-281-2013

3.1.2　反復投与

毒性試験の一環として、マウス（2.6.7.7.1 項；TX-281-2028、2.6.7.13.1 項；TX-281-2032）、ラット（2.6.7.7.2 項；TX-281-2003、2.6.7.7.3 項；TX-281-2007）、ウサギ（2.6.7.11 項；TX-281-2010、2.6.7.13.3 項；TX-281-2014）及びイヌ（2.6.7.7.4 項；TX-281-2004、2.6.7.7.5 項；TX-281-2008）にベルパタスビルを経口投与し、トキシコキネティクスプロファイルを評価した。2.6.6.3 項にこれらの試験結果の詳細を示す。

3.1.3　投与媒体の検討

ベルパタスビル固有の水に対する溶解度は低く（pH 8.2 で約 3 µg/mL）、絶食状態及び食後状態を模倣したいずれの人工腸液（SIF）ではその溶解度は若干高くなる（各々pH 6.5 及び pH 5.0 でそれぞれ 28 µg/mL 及び 210 µg/mL）（3.2.p.2.1 項）。ベルパタスビルの低溶解度のために、毒性試験での曝露量が制限された。マウス、ラット、ウサギ及びイヌに、有機溶媒ベースの溶媒又は水性懸濁液として高用量で経口投与したときの曝露量の増加率は用量比を下回った。毒性試験で至適な曝露量が得られる媒体を特定するため、ベルパタスビルを種々の媒体で経口投与したときの PK をラット及びウサギで評価した（2.6.5.3.5 項；AD-281-2020、2.6.5.3.7 項；AD-281-2035 及び 2.6.5.3.8 項；AD-281-2036）。

Sprague-Dawley ラットにベルパタスビルを 10 及び 30 mg/kg で単回経口投与したときの PK を以下の 3 種類の媒体で評価した（2.6.5.3.5 項；AD-281-2020）：A）15%Solutol HS 15、45%プロピレングリコール及び 40%水からなる溶液、塩酸で pH 値を 2.0 に調整、B）0.2%ヒドロキシプロピルメチルセルロース、0.2%ポリソルベート 20 及び 0.9%ベンジルアルコールからなる水性懸濁液、及び C）100% Capmul MCM, NF 溶液。ベルパタスビルの血漿中曝露量は、他の 2 つの媒体と比較して媒体 A を用いて投与したときの方がわずかに高かった。その後の毒性試験ではこの媒体を選択した。

雌 NZW ウサギにベルパタスビルを 600 mg/kg で単回経口投与したときの PK を以下の異なる 3 種類の媒体で評価した（2.6.5.3.7 項；AD-281-2035）：A）100%オレイン酸溶液、B）60%プロピレングリコール及び 40%Solutol HS 15 からなる溶液、及び C）0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース、0.1%ポリソルベート 20、0.9%ベンジルアルコール及び 98.5%水からなる懸濁液。ベルパタスビルの血漿中曝露量は、水溶性懸濁液（媒体 C）を用いて投与した場合に最も高く、その後の毒性試験ではこの媒体を選択した。さらに、雌 NZW ウサギに 25%Solutol HS-15/75%プロピレングリコール溶液でベルパタスビルを用量漸増して単回経口投与した（2.6.5.3.8 項；AD-281-2036）。ベルパタスビルの血漿中曝露量は 100～300 mg/kg の用量範囲ではほぼ用量比例的に増加したが、300～600 mg/kg ではさらに増加することはなかった。この媒体でのベルパタスビルの最高曝露量は、水性懸濁液（媒体 C）で得られた曝露量と同程度であった。

3.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

3.2.1 *In vitro* 吸収試験

Caco-2 単層膜細胞を用いた *in vitro* 試験で、ソホスブビルの双方向の膜透過性に対するベルパタスビルの影響を評価した（2.6.5.15.1.1 項；AD-334-2002）。1 µmol/L ベルパタスビル存在下で、ソホスブビル（10 µmol/L でインキュベート）の apical 側から basolateral 側（Forward）への透過性は 0.25×10^{-6} cm/s から 0.66×10^{-6} cm/s まで増加し、efflux ratio は 43.6 から 11.2 まで減少した。これらの結果は、ベルパタスビルとの併用でソホスブビルの曝露量が増加したという臨床での結果と一致する（2.7.2.2.2.2.1 項；GS-US-281-0101）。

4 分布

4.1 ベルパタスビル

4.1.1 *In vitro* タンパク結合率

4.1.1.1 ベルパタスビルのマウス、ラット、イヌ、サル及びヒト血漿タンパク結合率

平衡透析法を用いた *in vitro* 試験で、CD-1 マウス、Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬、アカゲザル、カニクイザル及びヒト血漿にベルパタスビルが 2 µmol/L となるように添加し、ベルパタスビルの血漿タンパク結合率を算出した（2.6.5.6.1 項；AD-281-2037 及び 2.6.5.6.2 項；AD-281-2001）。また、ベルパタスビルの濃度依存的なヒト血漿タンパク結合率（0.1～2 µmol/L）も平衡透析法で算出した（2.6.5.6.3 項；AD-281-2029）。ベルパタスビルは全ての動物種で高い血漿タンパク結合率を示した（99.5%超）（表 8）。臨床で認められたベルパタスビルの C_{max}（259 ng/mL、すなわち 0.293 µmol/L、2.7.2.3.2.1.3.1 項）を含む濃度範囲である 0.1～2 µmol/L で、ベルパタスビルのヒト血漿タンパク結合率に顕著な変化はなかった。

表 8 各動物種でのベルパタスビルの血漿タンパク結合率

Species	Unbound (%)	Bound (%)
CD-1 Mouse*	< 0.1	> 99.9
Sprague-Dawley Rat	0.22 ± 0.03	99.78 ± 0.03
Beagle Dog	0.19 ± 0.02	99.81 ± 0.02
Cynomolgus Monkey	0.41 ± 0.07	99.59 ± 0.07
Rhesus Monkey	0.28 ± 0.01	99.72 ± 0.01
Human	0.30 ± 0.02	99.70 ± 0.02

Initial velpatasvir concentration was 2 µmol/L.
Data presented as mean ± SD from 3 determinations, *: Mean (n=2)
Source: AD-281-2037 and AD-281-2001

4.1.1.2 CCM 中ベルパタスビルの血漿中ベルパタスビルに対する相対タンパク結合率

10%ウシ胎児血清含有 CCM とヒト血漿での平衡透析後のヒト血漿中ベルパタスビル濃度は CCM 中濃度より 52 倍高かった（2.6.5.6.2 項；AD-281-2001）。この比はヒト血漿中及び CCM 中ベルパタスビルの非結合型画分の差に対する補正係数となる。非結合型画分のみが標的タンパク質と相互作用すると考えられるため、CCM 中で測定した *in vitro* での 50%効果濃度（EC_{50}）値に CCM に対するヒト血漿中相対タンパク結合率を乗じることで、血漿タンパク結合率で補正した EC_{50} 値を算出することができる。

4.1.2 組織内分布試験

4.1.2.1 CD-1 マウス及び rasH2 マウスにおける組織内分布

雄 CD-1 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを 20 mg/kg で単回経口投与したときのベルパタスビルの組織内分布を評価した（2.6.5.5.1 項；AD-281-2021）。放射能は全身オートラジオグラフィーを用いて定量した。放射能は投与後 3 時間までにほぼ全ての組織に広く分布し、168 時間までに肝臓以外の全ての組織から消失した。最高放射能濃度が最も高かった組織は胆嚢、肝臓、腎臓及びハーダー腺であった。脳及び精巣に検出された放射能は一過性で低濃度であったことから、放射能はマウスの血液－脳関門及び血液－精巣関門をほとんど通過しないことが示唆された。

雄 CD-1 マウス及び rasH2 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを 20 mg/kg で単回経口投与したときの血液及び血漿中ベルパタスビルの PK を評価した。CD-1 マウス及び rasH2 マウスにおいて、それぞれ投与 2 時間後及び 3 時間後に平均血漿中放射能濃度が最高値に達した。CD-1 及び rasH2 マウスに経口投与したとき、放射能の血液／血漿中濃度比は投与後 24 時間までで 0.623 以下であった。このことから、放射能の血球移行は限定的であることが示唆された。

4.1.2.2 Sprague-Dawley ラット及び Long Evans ラットにおける組織内分布

雄 Sprague-Dawley ラット及び Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを 30 mg/kg で単回経口投与したときのベルパタスビルの組織内分布を評価した（2.6.5.5.2 項及び 2.6.5.5.3 項；AD-281-2018）。Sprague- Dawley ラット及び Long Evans ラットともに、放射能の血液／血漿中濃度比は 0.635 以下であり、放射能の血球移行は限定的であることが示唆された。Sprague-Dawley ラット及び Long Evans ラットのいずれにおいても、放射能は投与後 4 時間までにほぼ全ての組織に広く分布した。放射能は 96 時間までに眼のブドウ膜以外の全ての組織から消失した。組織中濃度を表 9 に、単回経口投与 4 時間後の Long Evans ラットのオートラジオグラムを図 2 に示す。

最高放射能濃度が最も高かった組織（GI を除く）は肝臓、副腎、腎髄質、腎臓、腎皮質及び膵臓であった。放射能は脳には検出されず、放射能がラットの血液－脳関門を通過しないことが示唆された。Sprague-Dawley ラットの精巣に検出された放射能は一過性で低濃度であったことから、放射能がラットの血液－精巣関門をほとんど通過しないことが示唆された。放射能は有色ラットの眼のブドウ膜に長く残存したが、有色皮膚及び白色皮膚に対する分布に顕著な差はなかった。

表 9　雄 Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを 30 mg/kg で単回経口投与したときの血液及び組織内放射能濃度

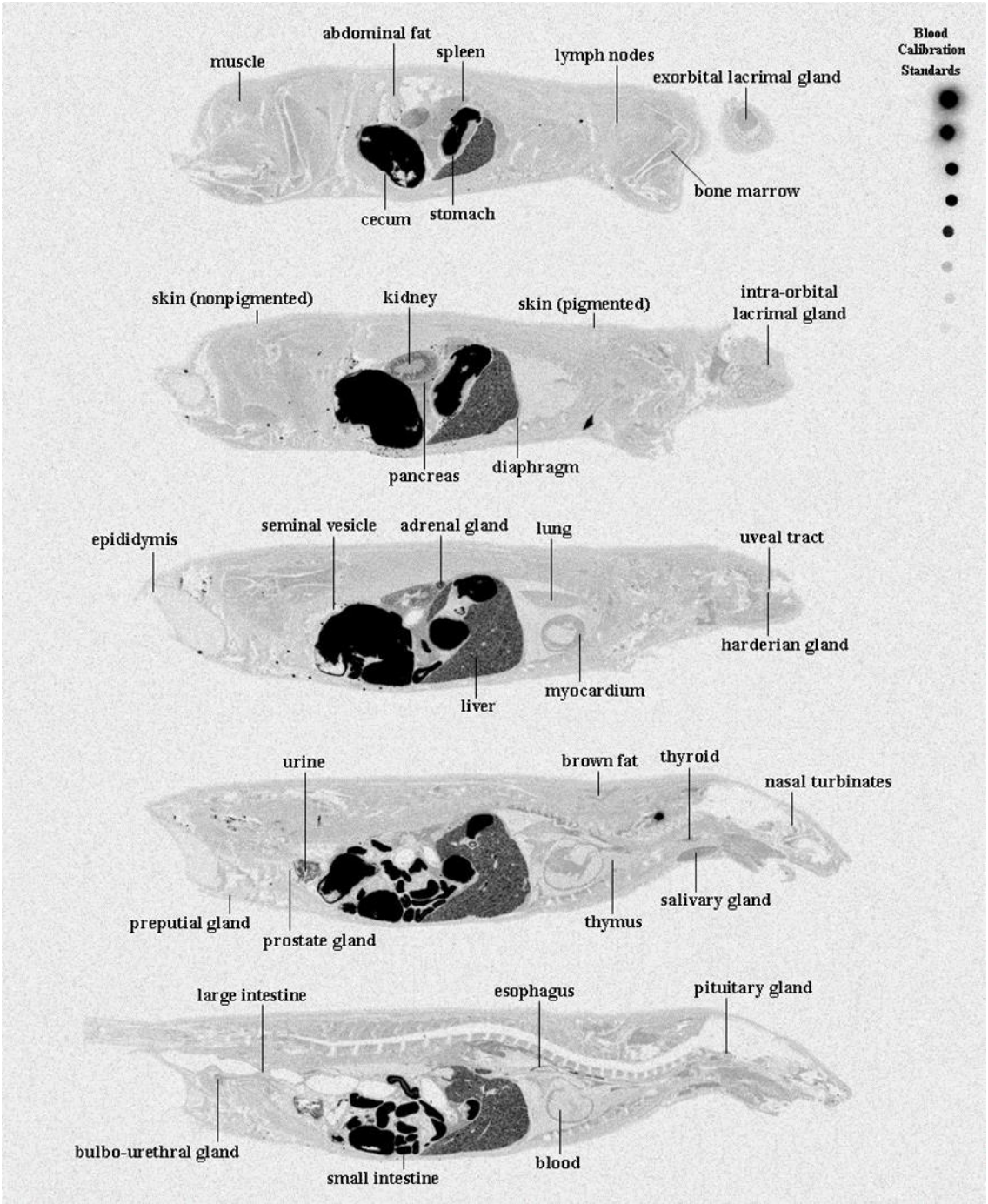
	ng Equivalents [^{14}C]Velpatasvir /g					
Tissue/Matrix	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**24 h**	**48 h**	**168 h**
Adrenal gland(s)	3720[a]	7000	9390	BLQ	ND	ND
Arterial wall	ND	ND	ND	323	ND	ND
Bile	15900	36100	31700	ND	ND	ND
Blood	419	574	580	ND	ND	ND
Bone	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Bone marrow	960	1610	2130	ND	ND	ND
Brain cerebellum	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Brain cerebrum	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Brain medulla	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	ND	1700	2260	ND	ND	ND
Cecum	669	1080	1350	BLQ	ND	ND
Diaphragm	775	1390	2040	ND	ND	ND
Epididymis	ND	BLQ	321	ND	ND	ND
Esophagus	540	706	1010	ND	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	376	719	1810	BLQ	ND	ND
Eye lens	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Eye uveal tract	ND	972	1800	2090	1550	1310
Eye(s)	ND	BLQ	BLQ	293	BLQ	BLQ
Fat (abdominal)	BLQ	BLQ	492	ND	ND	ND
Fat (brown)	1080	1320	2330	ND	ND	ND
Harderian gland	654	521	1380	1190	352	ND
Intra-orbital lacrimal gland	ND	353	1850	ND	ND	ND
Kidney cortex	4220	4930	4790	BLQ	ND	ND
Kidney medulla	2950	4720	5410	BLQ	ND	ND
Kidney(s)	3730	4740	4960	BLQ	ND	ND
Large intestine	565	851	1510	1280	BLQ	ND
Liver	8590	10400	10500	471	BLQ	ND
Lung(s)	993	1010	1570	ND	ND	ND
Lymph node(s)	BLQ	495	1070	ND	ND	ND
Muscle	435	625	1210	ND	ND	ND
Myocardium	1110	1690	2240	ND	ND	ND
Nasal turbinates	BLQ	BLQ	762	ND	ND	ND
Pancreas	1520	2810	3310	BLQ	ND	ND

表 9　雄 Long Evans ラットに[^{14C}]ベルパタスビルを 30 mg/kg で単回経口投与したときの血液及び組織内放射能濃度（続き）

	ng Equivalents [^{14}C]Velpatasvir /g					
Tissue/Matrix	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**24 h**	**48 h**	**168 h**
Pituitary gland	1320	1870	2170	ND	ND	ND
Preputial gland	ND	324[a]	434[a]	BLQ	ND	ND
Prostate gland	BLQ	BLQ	773	BLQ	ND	ND
Salivary gland(s)	1270	2410	3180	ND	ND	ND
Seminal vesicle(s)	BLQ	BLQ	332	ND	ND	ND
Skin (nonpigmented)	BLQ	348	646	ND	ND	ND
Skin (pigmented)	BLQ	342	663	ND	ND	ND
Small intestine	1310	5890	4130	BLQ	ND	ND
Spinal cord	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Spleen	1840	2140	2250	ND	ND	ND
Stomach	ND[b]	1550	1720	ND	ND	ND
Stomach mucosa	ND[b]	1750	2320	ND	ND	ND
Stomach wall	ND[b]	867	969	ND	ND	ND
Testis(es)	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Thymus	BLQ	337	822	BLQ	ND	ND
Thyroid	1650	2630	3150	ND	ND	ND
Urinary bladder	BLQ	667	986	ND	ND	ND
Urine	1750	3380	3970	ND	ND	ND

BLQ = below limit of quantitation (< 287 ng equivalents ^{14}C-velpatasvir/g); h = hour(s); ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue).
a Tissue appeared fat-soaked
b Tissue is not detectable due to flare from stomach contents
Source: AD-281-2018

図 2　雄 Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビル（30 mg/kg、100 µCi/kg）を単回経口投与したときの投与 4 時間後の全身オートラジオグラム（動物：B33423）



Source: AD-281-2018

4.1.2.3　妊娠及び授乳 Sprague-Dawley ラットにおける組織内分布

妊娠 13 日又は 18 日の妊娠 Sprague-Dawley ラットまたは授乳ラットに[^{14}C]ベルパタスビル（目標 30 mg/kg）を単回経口投与した（2.6.5.7.1 項；AD-281-2031）。投与後 24 時間までの血液、血漿及び乳汁中放射能濃度を液体シンチレーションカウンターで、投与後 24 時間までの特定の時点で

の妊娠ラットの組織内放射能を全身オートラジオグラフィーで定量した。

妊娠 13 日又は 18 日に投与した妊娠動物における血中及び血漿中最高放射能濃度は、それぞれ投与 2 時間後及び 4 時間後に認められた。妊娠 13 日又は 18 日に投与した動物において胎児血液中に放射能は検出されず、放射能が胎盤を通過しないことが示唆された。

妊娠 13 日又は 18 日に投与した妊娠ラットにおいて、初回採取時点（投与 1 時間後）までに放射能はほぼ全ての母体組織に分布した。妊娠 13 日又は 18 日に投与した妊娠ラットにおいて、それぞれ投与後 2 時間又は 4 時間までにほぼ全ての組織で放射能濃度は最高値に達した。非妊娠ラットでの放射能の組織内分布と同様に（2.6.5.5.2 項及び 2.6.5.5.3 項；AD-281-2018）、最高放射能濃度が最も高かった母体組織（GI を除く）は肝臓、副腎、腎臓、腎皮質、腎髄質及び膵臓であった。投与後 24 時間まで胎児中に放射能は検出されず、放射能が胎盤を通過しないことが確認された。放射能は投与後 24 時間までにほぼ全ての母体組織から消失した。

授乳ラットでは、血中及び血漿中最高放射能濃度は投与 2 時間後に認められた。乳汁中放射能は投与 1 時間後から 8 時間後まで定量可能であり、放射能の乳汁中への分泌が示唆された。乳汁中最高放射能濃度は投与 4 時間後に認められた。平均乳汁中／血漿中濃度比は投与 1 時間後で 0.42 であり、投与 8 時間後では 6.5 まで上昇した。平均乳汁中／血漿中曝露（濃度－時間曲線下面積［AUC］）比は 1.74 であった。最高濃度到達後、血中、血漿中及び乳汁中放射能濃度は投与後 8 時間までに減少し、投与後 24 時間では定量限界未満（BLQ）となった。

4.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

ソホスブビルとベルパタスビルの併用による非臨床分布試験は行わなかった。ソホスブビルとベルパタスビルの併用投与によって、各薬剤の分布プロファイルが変化するとは考えにくい。

5 代謝（動物種間の比較）

5.1 ベルパタスビル

5.1.1 *In vitro* 代謝

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト肝ミクロソーム並びにヒト凍結肝細胞を用い、ベルパタスビルの肝代謝を *in vitro* 試験で評価した（2.6.5.9.1 項；AD-281-2039 及び 2.6.5.9.2 項；AD-281-2006）。結果を表 10 に示す。マウス、サル及びヒト肝ミクロソームでベルパタスビルが代謝される割合は低かった。同様に、ヒト凍結肝細胞で代謝される割合も低く、算出できなかった。ラット及びイヌの肝ミクロソームでベルパタスビルが代謝される割合から算出した肝抽出率は 17.7%及び 20.5%であった。

また、ヒト NADPH CYP 還元酵素を共発現させた cDNA 発現ヒト CYP 発現系と共にベルパタスビルをインキュベートし、ベルパタスビルが代謝される割合を算出した（2.6.5.9.3 項；AD-281-2007）。ベルパタスビルと CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 又は CYP2D6 発現系とのインキュベーションでは意義のある代謝は認められなかった。また、ベルパタスビルが CYP2B6、CYP2C8 及び CYP3A4 によって代謝される割合は低かった（表 11）。ベルパタスビルが酸化代謝されたことと一致して、臨床試験でベルパタスビルを CYP 阻害剤のケトコナゾールと併用投与したところ、ベルパタスビルの AUC 及び C_{max} が増加し、ベルパタスビルを CYP 誘導剤であるリファンピシンと併用経口投与したところ、AUC 及び C_{max} はいずれも低下した（2.7.2.2.5.2.1 項；GS-US-281-0115）。

表 10 肝ミクロソームでのベルパタスビルの代謝

Species	$t_{½}$ (min)	Predicted Hepatic Clearance (L/h/kg)	Predicted Hepatic Extraction (%)
Mouse	272	0.98	18.2
Rat	192	0.743	17.7
Dog	163	0.369	20.5
Monkey	>395	<0.17	<10.6
Human	>395	<0.17	<12.7

Source: AD-281-2006 and AD-281-2039

表 11　ベルパタスビル及び陽性対照のヒト主要 CYP での代謝（min^{-1}）

Compound	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Velpatasvir	< 0.12	0.13	1.26	< 0.47	< 0.12	< 0.23	2.09
(% Positive Control)	(< 0.8%)	(6.6%)	(5.5%)	(< 2.2%)	(< 12%)	(< 1.0%)	(18%)
Ethoxycoumarin	14.2	—	—	—	—	—	—
Efavirenz	—	1.97[a]	—	—	—	—	—
Amodiaquine	—	—	23.1	—	—	—	—
Diclofenac	—	—	—	21.5	—	—	—
Diazepam	—	—	—	—	0.96[b]	—	—
Dextromethorphan	—	—	—	—	—	22.8	—
Testosterone	—	—	—	—	—	—	11.5

CYP = cytochrome P450
a　Efavirenz is a selective substrate for CYP2B6 but is metabolized slowly
b　Diazepam is a selective substrate for CYP2C19 but is metabolized slowly
Source: AD-281-2007

5.1.2　*In vivo* 代謝物の同定

CD-1 及び rasH2 マウス（2.6.5.10.1 項；AD-281-2022）、BDC 処置及び未処置 Sprague-Dawley ラット（2.6.5.10.3 項；AD-281-2019）、BDC 処置及び未処置イヌ（2.6.5.10.5 項；AD-281-2024）並びに健康被験者（2.7.2.2.2.2.3 項；GS-US-281-1055）に[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの血漿、胆汁、尿及び糞中代謝プロファイルを分析し、代謝物を同定した。結果を表 12 及び表 13 に示す。また、血漿、尿、胆汁及び糞中の代謝物の同定に基づくベルパタスビルの推定代謝経路を図 3 に示す。

血中には主に未変化体が検出された。血漿中総放射能に対する未変化体の割合は CD-1 マウスで約 71%、rasH2 マウスで 92%、ラットで 83%、イヌで 81%及びヒトで 99%であった（表 12）。全動物種の血漿中に *O*-脱メチル代謝物である脱メチル-ベルパタスビル（M19）が同定され、その割合は CD-1 マウス、ラット、イヌ及びヒトでそれぞれ血漿中総放射能の 7.1%、8.3%、12.4%及び 0.7%であった。ラット、イヌ及びヒト血漿中ではモノヒドロキシル化代謝物であるヒドロキシル-ベルパタスビル-1（M18）が同定され、その割合はラット、イヌ及びヒトでそれぞれ血漿中総放射能の 1.2%、3.1%及び 0.4%であった。CD-1 マウスの血漿中ではモノヒドロキシル化代謝物のヒドロキシル-ベルパタスビル-3（M23）及び *O*-脱メチルヒドロキシル化代謝物の脱メチル-ヒドロキシ-ベルパタスビル-2（M16）が同定され、その割合は血漿中総放射能のそれぞれ 17%及び 2.7%であった。

BDC 処置ラットで投与後 48 時間までに投与放射能の約 13%が胆汁中に回収され、BDC 処置イヌでは投与後 24 時間までに投与放射能の約 18%が胆汁中に回収された（表 13）。BDC 処置ラットの胆汁中には主に未変化体及び M19 が検出され、その割合はそれぞれ投与量の 1.6%及び 5.5%に相当した。BDC 処置イヌの胆汁中には主に未変化体及び M19 が検出され、その割合はそれぞれ投与量の 9.8%及び 5.8%であった。BDC 処置ラット及び BDC 処置イヌの両胆汁中で同定されたその他の代謝物は M18 及び脱メチル-ヒドロキシル-ベルパタスビル-1（M14）であった。

糞中には主に未変化体が検出され、投与量に対する未変化体の割合は CD-1 マウス、ラット、

イヌ及びヒトでそれぞれ 63.6%、80.8%、76.8%及び 76.6%であった（表 13）。CD-1 マウス、ラット、イヌ及びヒト糞中で主に検出された代謝物は M19 であり、その割合はそれぞれ投与量の 4.37%、5.44%、9.31%及び 3.0%であった。M18 は全動物種の糞中で多く認められたもう一つの代謝物であり、CD-1 マウス、ラット、イヌ及びヒトでの割合はそれぞれ投与量の 1.59%、2.68%、2.67%及び 5.9%であった。ヒト糞中で検出された未同定の 2 種類の代謝物 M7 及び M11 の割合はそれぞれ投与量の 2.8%及び 0.5%であった。CD-1 マウスの糞中で同定されたその他の代謝物は M23、ジヒドロキシ-ベルパタスビル（M24）及び M16 であった。

表 12　[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの血漿中主要代謝物（総血漿中 AUC に対する割合）

Compound	CD-1 Mouse	rasH2 Mouse	Sprague-Dawley Rat	Beagle Dog	Human	Compound
M1	ND	ND	0.18	ND	ND	M1
M16	2.70	ND	ND	ND	ND	M16
M18	ND	ND	1.24	3.10	0.4	M18
M19	7.10	ND	8.27	12.4	0.7	M19
M23	17.0	ND	ND	ND	ND	M23
Velpatasvir	70.8	92.0	82.7	81.0	98.9	Velpatasvir
Total	97.6	92.0	92.4	96.5	100	Total

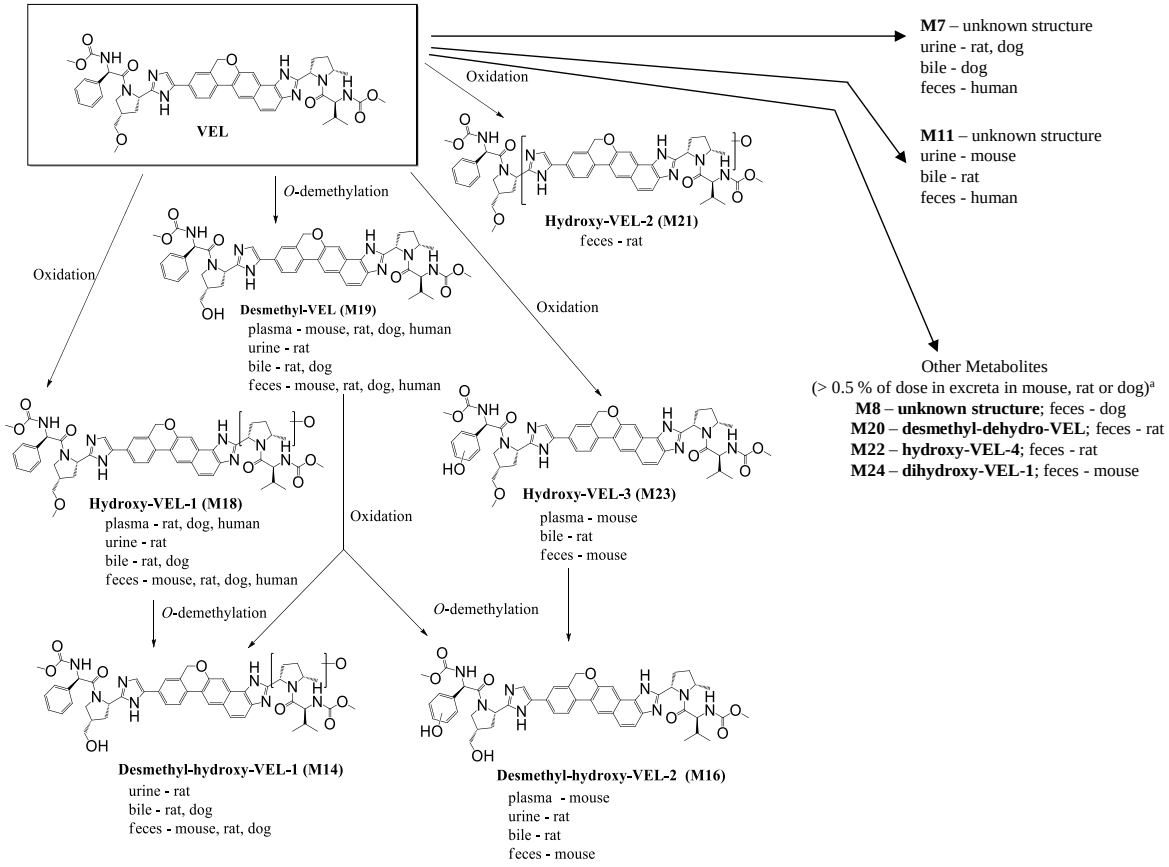
AUC = area under the plasma concentration-time curve from time zero to 12 hours post dose in CD-1 mice and rats, from time zero to 8 hours post dose in rasH2 mice and dogs, and from time zero to 24 hours postdose in human subjects; ND = not detected
Source: AD-281-2022, AD-281-2019, AD-281-2024 and GS-US-281-1055

表 13　[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの胆汁及び糞中の主要代謝物

Compound	% Total Dose Recovered in Bile (% of total in bile)		% Total Dose Recovered in Feces (% of total in feces)			
	Rat[a]	Dog[a]	CD-1 Mouse[a]	Rat[a]	Dog[a]	Human[a]
M7	ND	ND	ND	ND	ND	2.8 (3.2%)
M11	0.0490 (0.37%)	ND	ND	ND	ND	0.5 (0.56%)
M14	1.16 (8.72%)	0.405 (2.29%)	ND	0.708 (0.73%)	0.889 (0.95%)	ND
M16	0.820 (6.17%)	ND	2.27 (2.45%)	ND	ND	ND
M18	1.99 (15.0%)	0.899 (5.08%)	1.59 (1.72%)	2.68 (2.77%)	2.67 (2.86%)	5.9 (6.6%)
M19	5.50 (41.4%)	5.78 (32.7%)	4.37 (4.72%)	5.44 (5.62%)	9.31 (9.97%)	3.0 (3.4%)
M21	ND	ND	ND	0.950 (0.98%)	ND	ND
M23	0.258 (1.94%)	ND	6.71 (7.25%)	ND	ND	ND
Velpatasvir	1.55 (11.7%)	9.82 (55.5%)	63.6 (68.8%)	80.8 (83.5%)	76.8 (82.2%)	76.6 (86.3%)
Total	13.3	17.7	92.5	96.8	93.4	93.4

ND = not detected
a Minor metabolites are not shown. Complete metabolite profiles are presented m2.6.5, Section 10.2, 10.4 and 10.6.
Source: AD-281-2022, AD-281-2019, AD-281-2024, and GS-US-281-1055

図 3 [^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの血漿、尿、胆汁及び糞中で同定された代謝物に基づくベルパタスビルの推定代謝経路



a. Not observed in human excreta; also not observed in nonclinical or human plasma
b. Other metabolites with ≤ 0.5 % of dose in excreta in mouse, rat or dog with quantifiable peak in radiochromatogram include M12 – desmethyl-dihydroxy-VEL-1; M13 – desmethyl-dihydroxy-VEL-2/desmethyl-dihydroxy-VEL-3; M15 – dihydroxy-VEL-2; M17 – dihydroxy-VEL-3, M25 – hydroxy-VEL-glucuronide. M1, M2, M3, M4, M5, M6, M9, and M10 were also observed; their structures are unknown
Note: The metabolites and pathways are proposed based on general knowledge of metabolism and do not imply definitive pathways. Direct experimentation has not been performed.
Source: AD-281-2022, AD-281-2019, AD-281-2024, and GS-US-281-1055

5.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

ソホスブビルとベルパタスビルを共にヒト初代培養肝細胞でインキュベートし、ソホスブビルからの GS-461203 の生成に及ぼすベルパタスビルの影響を *in vitro* で評価した（2.6.5.12.1.1 項；AD-334-2010）。ベルパタスビル（10 µmol/L）の存在下又は非存在下でソホスブビル（10 µmol/L）を肝細胞と共に 2 時間インキュベートしたところ、GS-461203 の濃度はそれぞれ 49.5 及び 69.8 pmol/10^6 cells であった。以上の結果から、ベルパタスビルがソホスブビルの細胞内活性化に顕著な影響を及ぼすことはないことが示唆された。ヒト初代培養肝細胞におけるこれらの結果と一致して、HCV ジェノタイプ 1a、2a、3a 及び 4a レプリコン細胞系においてソホスブビルとベルパタスビルの併用によって相加的又は弱い相乗的抗ウイルス作用が認められた（2.7.2.4.1 項；PC-334-2004 及び PC-334-2014）。

6 排泄

6.1 ベルパタスビル

6.1.1 BDC 未処置マウス、ラット及びイヌ並びに BDC 処置ラット及びイヌにおける排泄

雄 CD-1 マウスに 20 mg/kg（2.6.5.13.1 項；AD-281-2021）、BDC 処置及び未処置雄 Sprague-Dawley ラットに 30 mg/kg（2.6.5.13.2 項；AD-281-2018）並びに BDC 処置及び未処置雄ビーグル犬に 10 mg/kg（2.6.5.13.3 項；AD-281-2023）で、[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与したときの放射能排泄率を算出した。

3 種類全ての動物種で、経口投与後の大部分の放射能は速やかに排泄された。経口投与後 168 時間までに、マウス、ラット及びイヌの糞中にそれぞれ投与放射能の 95.9%、96.9%及び 93.6%（平均値）が排泄された。これら動物の尿中には、投与放射能の 0.27%未満（平均値）が排泄された。BDC 処置ラットでは、糞、胆汁及び尿中にそれぞれ投与放射能の 83.1%、13.7%及び 0.248%（平均値）が排泄された。BDC 処置イヌでは、糞、胆汁及び尿中にそれぞれ投与放射能の 71.2%、18.7%及び 0.245%（平均値）が排泄された。経口投与後の放射能の平均総回収率はマウスで 96.5%、BDC 処置及び未処置ラットはいずれも 97.1%、未処置イヌで 94.9%及び BDC 処置イヌで 91.1%であった。

ベルパタスビルの胆汁及び尿中排泄について、BDC 処置の Sprague-Dawley ラットに 2 mg/kg の用量を 30 分かけた単回静脈内投与でも検討した（2.6.5.13.4 項；AD-281-2005）。ラット胆汁中には総投与量の 16%（平均値）が未変化体として回収された。ラット尿中で検出されたベルパタスビルはごくわずかであった。

以上の結果及び代謝物の分析結果から、マウス、ラット及びイヌにおいて、ベルパタスビルは未変化体及び代謝物として主に胆汁を介して排泄されることが明らかになった。

6.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

ソホスブビルはその主要代謝物である GS-331007 への代謝を経て腎から消失するのに対し、ベルパタスビルは未変化体及び肝代謝物として主に胆汁排泄により消失する。これらの排泄経路は異なるため、ソホスブビルとベルパタスビルの併用投与によって、各薬剤の排泄が変化するとは考えにくい。従って、ソホスブビルとベルパタスビルの併用による排泄試験は行わなかった。

7 薬物動態学的薬物相互作用

薬物相互作用の可能性の評価に用いた、ヒトにソホスブビル／ベルパタスビル配合錠を経口投与したときの PK パラメーターを表 14 に示す。

表 14 HCV 患者の定常状態でのソホスブビル、GS-331007 及びベルパタスビルの PK パラメーター

	SOF	GS-331007	VEL
Dose (mg)	400	-	100
Total C_{max} (µmol/L)[a]	1.07	3.34	0.293
Unbound C_{max} (µmol/L)[b]	0.409	3.10	0.000879 (0.00293[e])
Intestinal (µmol/L)[c]	3020	-	453
$C_{hep,\ inlet}$ (µmol/L)[d]	6.11	-	30.5
Unbound $C_{hep,\ inlet}$ (µmol/L)[d]	2.33	-	0.0915 (0.305[e])

a Values are the mean C_{max} based on population PK modeling using data from HCV-infected subjects.
b Unbound C_{max} calculated based on protein binding values measured *in vitro* of 61.8% for sofosbuvir (measured at 1.89 µmol/L), 7.2% GS-331007 (measured at 3.85 µmol/L), and 99.7% for velpatasvir (measured at 2 µmol/L).
c Intestinal concentrations are calculated based on an intestinal volume of 250 mL.
d Liver inlet concentration = C_{max} + (k_a × dose × F_aF_g/Q_h); where k_a and F_aF_g have not been determined and are assumed to be 0.1 min-1 and 1, respectiy. Qh for human is 1500 mL/min.
e Concentration based on an arbitrary 1% free concentration used to assess drug-drug interaction potential.
Source: m2.7.2, Section 3.2.1.3 and m2.6.5, Section 6.2, AD-281-2001
Conversions- sofosubuvir: 1 nmol/L = 0.529 ng/mL; GS-331007: 1 nmol/L = 0.260 ng/mL; velpatasvir: 1 nmol/L = 0.883 ng/mL,

7.1 ソホスブビル

ソバルディ®錠の日本での申請後に実施した試験の要約を本項に記載する。

7.1.1 CYP に対する阻害作用

ヒト肝ミクロソームを用いて、ソホスブビルによる主要な 6 種類の CYP（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP2D6）に対する不可逆的阻害について検討した結果、ソホスブビルはいずれの CYP に対しても不可逆的阻害を示さなかった（2.6.5.12.1.2 項；AD-334-2026）。

7.1.2 カルボキシルエステラーゼとの相互作用

ソホスブビルのカルボキシルエステラーゼ 1 を介した薬物相互作用を *in vitro* で検討した。カルボキシルエステラーゼ 1 の基質であるイリノテカン（10 µmol/L）に対するソホスブビル（最高濃度 100 µmol/L）及びその主要代謝物である GS-331007（最高濃度 300 µmol/L）をヒト初代肝細胞で評価したところ、細胞内のイリノテカン濃度はソホスブビル及び GS-331007 併用で影響を受けなかった（2.6.5.15.1.4 項；AD-334-2025）。さらに、ソホスブビルの代謝もイリノテカン（10 µmol/L）の影響を受けなかった。これらの結果から、臨床においてソホスブビルとイリノテカンとの併用による薬物相互作用が生じる可能性は低いことが示唆された。

7.1.3 トランスポーターとの相互作用

ソホスブビルの P-gp を介した薬物相互作用、GS-331007 の P-gp、OCT1、OCT2、MATE1、OAT3、BSEP 及び MRP2 を介した薬物相互作用について、適切な実験系で評価した。その結果、ソホスブビル（最高濃度 300 µmol/L）の P-gp に対する阻害作用は弱いか、ほとんど認められなかった（2.6.5.15.1.2 項；AD-334-2023）。また、GS-331007（最高濃度 300 µmol/L）の P-gp、OCT1、OCT2、MATE1、OAT3、BSEP 及び MRP2 に対する阻害作用も弱いか、ほとんど認められなかった（2.6.5.15.1.3 項；AD-334-2024）。

7.2 ベルパタスビル

7.2.1 CYP 及び UGT1A1 に対する阻害作用

ヒト肝ミクロソーム及び各酵素の典型的基質を用いて、ベルパタスビルによるヒト主要 CYP に対する阻害の可能性を評価した（2.6.5.12.2.1 項；AD-281-2008）。*In vitro* でのベルパタスビルによる CYP 阻害の IC_{50} 値を表 15 に示す。ベルパタスビルは評価した CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4 のいずれも阻害しなかった（IC_{50} 値> 25 µmol/L）。従って、ベルパタスビルはこれら酵素によって代謝される薬物の代謝を阻害しないと考えられる。

表 15 ベルパタスビル及び典型的阻害剤の主要なヒト CYP に対する IC_{50} 値

Enzyme	Activity	Calculated IC_{50} (µmol/L)	
		Control Inhibitor	Velpatasvir
CYP1A2	Ethoxyresorufin *O*-deethylase	0.06	> 25
CYP2B6	Bupropion 4-hydroxylase	0.68	> 25
CYP2C8	Paclitaxel 6α-hydroxylase	0.55	> 25
CYP2C9	Tolbutamide 4-hydroxylase	0.60	> 25
CYP2C19	*S*-Mephenytoin 4'-hydroxylase	7.08	> 25
CYP2D6	Dextromethorphan *O*-demethylase	0.04	> 25
CYP3A	Midazolam 1'-hydroxylase	0.04	> 25
CYP3A	Testosterone 6β-hydroxylase	0.09	> 25

CYP = cytochrome P450; IC_{50} = concentration resulting in 50% inhibition
Values are the mean of triplicate determinations
Control Inhibitors: CYP1A2, α-Naphthoflavone (0−3 µmol/L); CYP2B6, ticlopidine (0-10 µmol/L); CYP2C8, Montelukast (0−3 µmol/L); CYP2C9, Sulfaphenazole (0−10 µmol/L); CYP2C19, Tranylcypromine (0−50 µmol/L); CYP2D6, Quinidine (0−3 µmol/L); CYP3A, Ketoconazole (0−3 µmol/L)
Source: AD-281-2008

UGT1A1 に対するベルパタスビルの阻害作用について、バキュロウイルス発現ヒト UGT1A1 を含有する昆虫細胞ミクロソーム画分を用い、*in vitro* で評価した（2.6.5.12.2.2 項；AD-281-2016）。ベルパタスビルは UGT1A1 に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 1.56 µmol/L であった。しかし、IC_{50} 値が血漿中の非結合型 C_{max}（< 3 nmol/L）を大きく上回ることから、ベルパタスビルが UGT1A1

阻害剤として臨床的に問題となる可能性は低い。ソホスブビル／ベルパタスビル配合錠とUGT1A1 の基質であるドルテグラビルとの臨床薬物相互作用試験の結果から、臨床濃度のベルパタスビルによる阻害作用は認められなかった（2.7.2.2.5.1.1 項 ; GS-US-342-1167）。

7.2.2 誘導作用

ベルパタスビルの AhR 及び PXR 活性化によるヒト薬物代謝酵素誘導の可能性について、レポーター細胞株を用いて *in vitro* で評価した（2.6.5.12.2.3 項 ; AD-281-2009）。ベルパタスビルは検討した最高濃度（50 µmol/L）でも AhR を活性化しなかったが、陽性対照の β-ナフトフラボンは溶媒対照と比較して最高 70 倍まで活性化させた（表 16）。また、ベルパタスビルの PXR 活性化について陽性対照にリファンピシンを用いて評価した。リファンピシンで処置したところ、レポーター遺伝子の発現を最高 12.7 倍活性化させた。一方、ベルパタスビルによる PXR 活性化の程度は 50 µmol/L でもリファンピシンによる最大活性化の 23%未満であった（表 16）。以上の結果から、ベルパタスビルが AhR 及び PXR 標的遺伝子を活性化させる可能性はごくわずかであることが示唆された。

表 16　ベルパタスビル又は陽性対照によるヒト AhR 及び PXR の活性化

Concentration (μmol/L)	Fold Activation Over 0.1% Dimethyl Sulfoxide Control			
	Human AhR[a]		Human PXR[b]	
	Velpatasvir	β-Naphthoflavone	Velpatasvir	Rifampicin
0.1	—	1.61	—	1.68
0.15	0.97	—	1.30	—
0.5	0.81	2.80	1.67	4.45
1.0	—	4.15	—	6.23
1.5	0.76	—	2.48	—
5.0	0.73	21.5	2.53	11.6
10	—	41.6	—	12.7
15	0.61	—	2.91	—
20	—	70.0	—	12.6
50	0.77	—	2.70	—

AhR = aryl hydrocarbon receptor; PXR = pregnane X receptor
a Fold activation of CYP1A2 promoter after 24 hours incubation at the indicated extracellular concentration.
b Fold activation of CYP3A4 promoter after 24 hour incubation at the indicated extracellular concentration.
Source: AD-281-2009

ベルパタスビルが CYP、UGT1A1 及び P-gp を誘導する可能性について、3 例のドナーから得たヒト培養肝細胞で評価した（2.6.5.12.2.4 項；AD-281-2025）。CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A に特異的な酵素活性測定により誘導を評価した。CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP3A4、P-gp 及び UGT1A1 について mRNA 発現の誘導を評価した。

ベルパタスビルは CYP の mRNA 又は酵素活性をほとんど又はまったく誘導しなかった。検討した最高濃度の 10 μmol/L で、CYP2B6 及び CYP3A4 の活性並びに mRNA 発現量のわずかな上昇が認められたが、これは陽性対照による誘導作用の 20%未満であった（表 17 及び表 18）。CYP2C9 の mRNA（溶媒対照に対する倍率 1.37～1.57）、P-gp の mRNA（溶媒対照に対する倍率 1.37～1.47）及び UGT1A1 の mRNA（溶媒対照に対する倍率 1.50～1.57）に濃度依存性の上昇は認められなかった。以上の結果から、ベルパタスビルが臨床的に問題となる誘導剤として作用する可能性は低いことが示された。

表 17　ヒト培養肝細胞でのベルパタスビルの CYP 活性に対する影響

Treatment	Fold Increase of CYP Activity over Vehicle Control (Percent Increase Relative to Positive Control)		
	CYP1A2	CYP2B6	CYP3A
Velpatasvir (1 µmol/L)	1.10 (3.1%)	1.73 (20%)	1.58 (6.2%)
Velpatasvir (3 µmol/L)	0.92 (2.6%)	1.73 (20%)	1.69 (6.7%)
Velpatasvir (10 µmol/L)	0.83 (2.4%)	1.67 (20%)	1.67 (6.6%)
Omeprazole (50 µmol/L)	35.3	NA	NA
Phenobarbital (1000 µmol/L)	NA	8.53	NA
Rifampin (10 µmol/L)	NA	NA	25.3

CYP = cytochrome P450; NA= not applicable
Probe substrates were phenacetin, bupropion, and testosterone for CYP1A2, 2B6, and 3A, respectiy.
Data represent the mean from 3 donors
Source: AD-281-2025

表 18　ヒト培養肝細胞でのベルパタスビルの mRNA 発現量に対する影響

Treatment	mRNA Fold Increase over Vehicle Control					
	CYP1A2	CYP2B6	CYP3A4	CYP2C9	UGT1A1	P-gp
Velpatasvir (1 µmol/L)	0.86 ± 0.22	1.90 ± 0.61	7.70 ± 5.76	1.57 ± 0.55	1.57 ± 0.21	1.37 ± 0.12
Velpatasvir (3 µmol/L)	0.76 ± 0.22	1.43 ± 0.32	13.5 ± 14.3	1.37 ± 0.25	1.53 ± 0.15	1.47 ± 0.25
Velpatasvir (10 µmol/L)	0.77 ± 0.39	1.58 ± 0.68	11.9 ± 11.5	1.46 ± 0.52	1.50 ± 0.30	1.43 ± 0.32
Omeprazole (50 µmol/L)	50.0 ± 50.3	NA	NA	NA	NA	NA
Phenobarbital (1000 µmol/L)	NA	17.0 ± 5.0	NA	NA	NA	2.23 ± 0.15
Rifampin (10 µmol/L)	NA	NA	114 ± 70	3.17 ± 0.32	NA	NA
β-naphthoflavone (20 µmol/L)	NA	NA	NA	NA	2.60 ± 1.15	NA

CYP = cytochrome P450; NA = not applicable; P-gp = P-glycoprotein; UGT = uridine diphosphate glucuronosyl transferase
Data are the mean ± SD from 3 donors
Source: AD-281-2025

7.2.3　トランスポーターとの相互作用

ベルパタスビルが排出トランスポーター及び取り込みトランスポーターの基質になる可能性について、発現系細胞を用いた *in vitro* 試験で評価した。P-gp 及び BCRP 発現 MDCKII 細胞を用いた P-gp 及び BCRP 依存性の蓄積性の評価に基づき、ベルパタスビルはこれらトランスポーターの基質であることが確認された（2.6.5.15.2.4 項；AD-281-2041）。これらのトランスポーターの阻害

剤であるシクロスポリン A（CsA）を用いた臨床薬物相互作用試験で、吸収における P-gp 及び／又は BCRP の役割が確認され、ベルパタスビルの吸収増加が認められた（2.7.2.2.5.2.1 項；GS-US-281-0115）。ベルパタスビルが OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質になる可能性について、これらトランスポーター発現 CHO 細胞及び WT-CHO 細胞を用いて評価した（2.6.5.15.2.3 項；AD-281-2011 及び 2.6.5.15.2.6 項；AD-281-2026）。これらの *in vitro* 試験では、ベルパタスビルが OATP1B1、OATP1B3 又は OCT1 の基質であることを裏付ける明白なエビデンスは得られなかった。しかし、相互作用薬であるリファンピシンを単回投与した臨床試験で、ベルパタスビルは OATP1B1 及び／又は OATP1B3 によって弱い影響を受けることが示された（2.7.2.2.5.2.1 項；GS-US-281-0115）。

個々のトランスポーター発現細胞株又は膜ベシクルを用い、ベルパタスビルのトランスポーター阻害の可能性について *in vitro* で評価した（2.6.5.15.2.1 項；AD-281-2010、2.6.5.15.2.2 項；AD-281-2040、2.6.5.15.2.5 項；AD-281-2012 及び 2.6.5.15.2.6 項；AD-281-2026）。結果を表 19 に示す。ベルパタスビルは P-gp、BCRP、BSEP、OATP1B1 及び OATP1B3 に対して用量依存性の阻害を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 20.6、0.30、0.64、1.5 及び 0.26 µmol/L であった。ベルパタスビルによる OCT1、OCT2 及び MATE1 に対する弱い阻害が認められ、その程度は検討した最高濃度（4 µmol/L）で 22%、45%及び 19%の阻害であった。ベルパタスビルは MRP2、NTCP、OAT1、OAT3 及び OATP1A2 の活性を阻害しなかった。*In vitro* 試験において、検討したベルパタスビルの最高濃度（10 µmol/L）で OATP2B1 に対する弱い阻害（30%）が認められ、GI 内におけるこのトランスポーターOATP2B1 に対する阻害の可能性が示唆された。

ベルパタスビルは *in vitro* 試験において多くのトランスポーターに対する阻害作用を示すが、血漿タンパク結合率が高いこと及び血漿中濃度が低いことから、全身循環を介して薬物相互作用を引き起こす可能性は低い。P-gp、MRP2、NTCP、OATP1B1、OATP1A2、OATP2B1、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3 及び MATE1 に対するベルパタスビルの IC_{50} 値は非結合型 C_{max}（2.93 nmol/L、タンパク非結合率 1%と仮定）の 500 倍超であり、これらトランスポーターを介した薬物相互作用の可能性はないことが示唆された。OATP1B3（0.26 µmol/L）及び BCRP（0.30 µmol/L）に対する IC_{50} 値はベルパタスビルの非結合型 C_{max} の 80 倍超であり、これらトランスポーターを介した全身的な薬物相互作用を引き起こす可能性はわずかであることが示唆された。

GI 内の最高濃度が 453 µmol/L と推定されることから、ベルパタスビルは GI に発現する P-gp、BCRP 及び OATP2B1 を阻害する可能性がある。*In vitro* 試験の結果と一致して、BCRP の典型的基質であるロスバスタチン及び P-gp の典型的基質であるジゴキシンを併用投与したところ、ベルパタスビルはこれら薬剤の曝露量を増加させた（2.7.2.2.5.2.1 項；GS-US-281-0115）。

門脈内の非結合型薬物濃度が 0.305 µmol/L（血漿タンパク非結合率を 1%と仮定）と推定されることから、ベルパタスビルが初回通過過程で OATP1B1（IC_{50} 値＝1.5 µmol/L）及び OATP1B3（IC_{50} 値＝0.26 µmol/L）をある程度阻害する可能性も示された。これらの *in vitro* 試験での所見に基づき、臨床薬物相互作用試験を実施し、ベルパタスビルが OATP の基質であるプラバスタチン濃度をやや上昇（40%未満）させることが確認された（2.7.2.2.5.2.1 項；GS-US-281-0115）。同試験で認められたロスバスタチンの曝露の顕著な増加も OATP の阻害が原因である可能性が考えられた。

表 19　ベルパタスビルによるトランスポーターの阻害

Transporter	Maximum Inhibition at Highest Concentration Tested (Concentration)	IC_{50} (µmol/L)	Report
P-gp	66% (40 µmol/L)	20.6 ± 5.7	AD-281-2010
BCRP	100% (40 µmol/L)	0.30 ± 0.04	AD-281-2010
MRP2	No Inhibition (40 µmol/L)	> 40	AD-281-2012
BSEP	90% (40 µmol/L)	0.64	AD-281-2012
NTCP	No Inhibition (40 µmol/L)	> 40	AD-281-2012
OATP1B1	80% (40 µmol/L)	1.5 ± 0.5	AD-281-2010
OATP1B3	92% (40 µmol/L)	0.26 ± 0.03	AD-281-2010
OATP1A2	No Inhibition (10 µmol/L)	NA	AD-281-2040
OATP2B1	30% (10 µmol/L)	> 10	AD-281-2040
OCT1	22% (4 µmol/L)	> 4	AD-281-2026
OCT2	45% (4 µmol/L)	> 4	AD-281-2026
OAT1	No Inhibition (4 µmol/L)	> 4	AD-281-2026
OAT3	No Inhibition (4 µmol/L)	> 4	AD-281-2026
MATE1	19% (4 µmol/L)	> 4	AD-281-2026

BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP = bile salt export pump; IC_{50} = concentration resulting in 50% inhibition; P-gp = P-glycoprotein; MATE = multidrug and toxin extrusion protein; MRP = multidrug resistance associated protein; NA = not applicable; NTCP = Na+-taurocholate cotransporting polypeptide; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion-transporting polypeptide; OCT = organic cation transporter

7.3　ソホスブビル／ベルパタスビル

7.3.1　CYP 及び UGT1A1 に対する阻害

非臨床試験からソホスブビル及びベルパタスビルは、典型的な薬物代謝酵素系に対し臨床的に影響を及ぼす阻害剤でも誘導剤でもないことが示唆され、ソホスブビルとベルパタスビルの併用により、CYP 又は UGT1A1 を介した薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

7.3.2　細胞内活性化

ソホスブビルの細胞内活性化経路は活性が高く、通常の併用薬によって阻害される可能性は低い。*In vitro* 試験においてソホスブビル及びベルパタスビルをヒト初代培養肝細胞と同時にインキュベートしたところ、ソホスブビルの活性代謝物である GS-461203 の生成に顕著な影響はなかった（2.6.5.12.1.1 項；AD-334-2010）。ヒト初代培養肝細胞におけるこれらの結果と一致して、HCV ジェノタイプ 1a、2a、3a 及び 4a レプリコン細胞系においてソホスブビルとベルパタスビルの併用によって相加的かわずかに相乗的な抗ウイルス活性が認められた（2.7.2.4.1 項；PC-334-2004 及び PC-334-2014）

7.3.3　誘導作用

ヒト培養肝細胞において、ソホスブビル又はベルパタスビルの個別の誘導試験により、CYP に

対するわずかな誘導の可能性が認められた。検討したソホスブビル及びベルパタスビルの最高濃度で、CYP2B6 及び CYP3A4 の活性及び／又は mRNA 発現量のわずかな上昇が認められたが、これは各陽性対照による誘導作用の 20%未満であった。従って、ソホスブビルとベルパタスビルの併用により臨床的に問題となる誘導作用は起こらないと考えられる。*In vitro* での試験結果と一致して、臨床薬物相互作用試験では誘導を裏付けるエビデンスは認められなかった。例えば、ソホスブビル／ベルパタスビル配合錠は、併用投与した非ヌクレオシド阻害剤（エファビレンツ及びリルピビリン）、インテグラーゼ阻害剤（ラルテグラビル、ドルテグラビル及びエルビテグラビル）又はブーストされたプロテアーゼ阻害剤（アタザナビル、ロピナビル又はダルナビル）などの抗レトロウイルス薬の血中濃度に対して意味のある減少を誘発することはなかった（2.7.2.2.5.1.1 項；GS-US-342-1167 及び 2.7.2.2.5.1.2 項；GS-US-342-1326）。同様に、併用投与した CsA に対するベルパタスビルの影響はわずかであった（2.7.2.2.5.2.1 項；GS-US-281-0115）。

7.3.4 トランスポーターとの相互作用

ソホスブビルとベルパタスビルはいずれも吸収過程でトランスポーターを介した薬物相互作用に関与する可能性がある。ソホスブビル及びベルパタスビルはいずれも GI の排出トランスポーターの基質であり、その吸収は排出トランスポーター阻害剤との併用投与により上昇し、その誘導剤によって減少する可能性がある。ベルパタスビルは、吸収過程で達しうる GI 内濃度で P-gp 及び BCRP を阻害する可能性がある。*In vitro* 試験においてソホスブビルの Caco-2 細胞単層膜での膜透過性はベルパタスビルなどのトランスポーター阻害剤の存在で上昇し（2.6.5.15.1.1 項；AD-334-2002）、ソホスブビルの血漿中曝露量はベルパタスビルとの併用で増加した（2.7.2.2.2.2.1 項；GS-US-281-0101）。

血漿中濃度に基づくと、ソホスブビルとベルパタスビルの併用で、トランスポーター阻害による全身循環への影響の可能性は認められなかった。ベルパタスビルは、臨床試験で OATP の基質であるプラバスタチンの血中濃度を軽度に上昇させたことから示されるとおり、OATP1B1 及び OATP1B3 の阻害剤である。ソホスブビル及びその主要代謝物である GS-331007 は OATP1B1、OATP1B3 又は OCT1 の基質でも阻害剤でもない。

ソホスブビル、その主要代謝物である GS-331007 及びベルパタスビルは、臨床濃度で腎トランスポーターOCT2、OAT1、OAT3 及び MATE1 を阻害しなかった。GS-331007 は糸球体ろ過及び活発な尿細管分泌によって腎臓から排泄されるが、これら腎トランスポーターの基質ではない。ソホスブビルとベルパタスビルの併用により、これら腎トランスポーターの阻害を介して薬物間相互作用が誘発される可能性はない。

8　その他の薬物動態試験

その他の非臨床 PK 試験は実施しなかった。

9 考察及び結論

ソホスブビル及びベルパタスビルの吸収、分布、代謝、排泄及び薬物相互作用の評価が各薬剤で包括的に実施された。これらの非臨床試験から得られた結果を以下に示す。

9.1 ベルパタスビル

ベルパタスビルの毒性評価にマウス、ラット、ウサギ及びイヌを選択することの妥当性が吸収、分布、代謝及び排泄試験によって裏付けられた。動物におけるベルパタスビルの代謝及び排泄プロファイルは臨床試験においてヒトで認められたプロファイルと一致した。試験した全動物種においてベルパタスビルを経口投与したときの血漿中の主要な循環成分は未変化体であり、ヒト血漿中では総曝露量の 98%超に相当した。未変化体及び代謝物の胆汁中排泄がベルパタスビルの主要な消失経路であった。

非臨床動物種（ラット、イヌ及びサル）にベルパタスビルを溶液として投与したときの F は中程度であった（25%～30%と推定）。ベルパタスビルの水に対する低い溶解度のため、高用量では吸収飽和が認められた。検討した全ての動物種（ラット、ウサギ、イヌ及びサル）で、ベルパタスビルの CL は低く（肝血流量の 14%～25%）、分布容積は大きかった（V_{ss} は 1.5～1.6 L/kg）。ベルパタスビルを種々の動物の肝ミクロソーム及びヒト肝細胞と共にインキュベートしたとき、ベルパタスビルの代謝される割合は低かった。ベルパタスビルの代謝に CYP2B6、CYP2C8 及び CYP3A4 の関与が示唆された。マウス、ラット、イヌ及びヒトに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したときの循環血中の主成分は未変化体であり、総血漿中放射能の 71%超に相当した。マウス、ラット、イヌ及びヒトのいずれの糞中にも、主に未変化体が検出され、投与量の 63%超に相当した。これは、ベルパタスビルが GI から吸収されにくいこと、及び吸収されたベルパタスビルが胆汁中に排泄されることを示すものである。BDC 処置ラット及びイヌの胆汁中には、未変化体としてそれぞれ投与量の 1.6%及び 9.8%が排泄され、これは胆汁中放射能のそれぞれ 11.7%及び 55.5%に相当した。吸収量を考慮すると、*in vivo* におけるベルパタスビルの主要な消失過程は未変化体並びに酸化及び／又は *O*-脱メチル化による代謝物の胆汁中排泄であると考えられた。

ベルパタスビルは検討した全ての動物種で高い血漿タンパク結合率（99.5%超）を示し、体内に良好に分布する。マウス及びラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したとき、放射能はほぼ全ての組織、特に肝臓に速やかに分布した。ベルパタスビルはメラニンと結合する可能性があるが、有色皮膚からの消失は速やかであった。マウスの脳並びにマウス及びラットの精巣で検出された放射能は一過性で低濃度であったことから、放射能がマウスの血液－脳関門並びにマウス及びラットの血液－精巣関門をほとんど通過しないことが示唆され、これはベルパタスビルが排出トランスポーターの基質であることと一致した。妊娠ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したとき、放射能は胎盤を通過せず、胎児の血液及び全身に放射能は検出されなかった。授乳ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与したとき、乳汁中放射能の T_{max} は 4 時間であり、投与後 24 時間までに検出されなくなった。

ベルパタスビルは主要な CYP の阻害剤ではないことから、CYP 阻害を介した薬物相互作用の相互作用薬となる可能性は低い。しかし、CYP3A4、CYP2B6 及び CYP2C8 はベルパタスビルの消失に寄与している。従って、ベルパタスビルの全身曝露量はこれらの酵素の誘導剤との併用で

減少し、阻害剤との併用で上昇する可能性がある。代表的な CYP 阻害剤であるケトコナゾール及び誘導剤であるリファンピシンを用いた臨床試験によって、ベルパタスビルの消失に及ぼす CYP 代謝の寄与が裏付けられた。

ベルパタスビルは *in vitro* 試験において UGT1A1 に対する阻害作用を示す（IC_{50} 値 1.56 μmol/L）。しかし、臨床での血漿中非結合型濃度は低く、ベルパタスビルが UGT1A1 の基質に対して相互作用を示す可能性は低いと考えられる。臨床薬物相互作用試験において UGT1A1 の基質であるドルテグラビルは、ソホスブビル／ベルパタスビルとの併用によって影響を受けなかった。

ベルパタスビルは PXR、CAR 又は AhR 介在性経路を介した臨床的に問題となる誘導剤ではないと考えられる。*In vitro* 試験では検討した最高濃度（50 μmol/L）で、AhR を活性化せず、PXR をわずかに活性化した。さらに、ヒト培養肝細胞においてベルパタスビルは 10 μmol/L 以下の濃度で、CYP、UGT1A1 又は P-gp の活性及び／又は mRNA 発現量に対して濃度依存的な誘導を示さなかった。

ベルパタスビルの薬物相互作用の可能性は主に吸収過程に限定される。ベルパタスビルは P-gp 及び BCRP の基質であり、その吸収はこれら排出トランスポーターの誘導剤との併用投与によって低下し、阻害剤との併用投与で上昇する可能性がある。CsA と併用投与した場合、ベルパタスビルの AUC 及び C_{max} は上昇した。ベルパタスビルは吸収過程での GI 内濃度で P-gp 及び BCRP を阻害する可能性があり、これらトランスポーターの基質を併用投与した場合、その GI 吸収に影響を及ぼすことも考えられる。一方、非結合型薬物濃度が低いことから、全身循環中のベルパタスビルによってトランスポーターを介した臨床的意義のある薬物相互作用が生じる可能性は低い。ベルパタスビルは MRP2、NTCP、OAT1、OAT3 及び OATP1A2 を阻害しなかった。ベルパタスビルは全身循環中で OCT1、OCT2、MATE1 及び OATP2B1 に対して臨床的に意義ある阻害剤ではない。ベルパタスビルは OATP1B1 及び OATP1B3 の阻害剤であるが（IC_{50} 値はそれぞれ 1.5 及び 0.26 μmol/L）、非結合型薬物濃度が低いため、これらトランスポーターに対してベルパタスビルが阻害する可能性は低いと考えられる。ヒトにおいてスタチン（ロスバスタチン及びプラバスタチン）をベルパタスビルと併用投与した場合、スタチンの血漿中 AUC 及び C_{max} が上昇したことから、ベルパタスビルは弱い OATP 阻害を示すと考えられた。

9.2 ソホスブビル／ベルパタスビル

非臨床試験でのソホスブビル及びベルパタスビルの吸収、分布、代謝及び排泄プロファイルから、HCV の治療においてこれら 2 種類の薬剤を配合錠として使用することの有用性が裏付けられる。

ソホスブビルとベルパタスビルの代謝及び消失経路は異なり、肝臓又は全身の循環中で互いの PK プロファイルに影響を及ぼすことはない。ソホスブビルのタンパク結合率は比較的低く（ヒト血漿中で 70%未満）、速やかな肝初回通過と加水分解酵素による広範な代謝を受け、脱リン酸化ヌクレオシド代謝物（GS-331007）として主に腎臓から排泄される。反対に、ベルパタスビルの血漿タンパク結合率は高く（検討した全ての動物種で 99.5%超）、CYP2B6、CYP2C8 及び CYP3A4 によって緩徐に代謝される。非臨床動物種における CL は低く、未変化体並びに酸化及び *O*-脱メチル化による代謝物として主に胆汁中に排泄される。ソホスブビルはヒト初代培養肝細胞において薬理活性を有する三リン酸塩代謝物である GS-461203 に代謝されるが、*in vitro* 試験で認められた相加的な抗ウイルス活性と一致して、このソホスブビルの細胞内活性化にベルパタスビルが影

響を及ぼすことはない。

ソホスブビル、その主要代謝物である GS-331007 及びベルパタスビルは、典型的な薬物代謝酵素系の臨床的に意義ある阻害剤でも誘導剤でもない。ソホスブビルとベルパタスビルの併用が、CYP 又は UGT1A1 を介した薬物相互作用を引き起こす可能性は低い。

ソホスブビルとベルパタスビルは吸収過程でトランスポーターを介した薬物相互作用を受ける可能性がある。ソホスブビル及びベルパタスビルはいずれも P-gp 及び BCRP の基質であり、その吸収は排出トランスポーターの阻害剤との併用投与で上昇し、その誘導剤との併用で減少すると考えられる。ソホスブビル及びその主要代謝物である GS-331007 は P-gp 及び BCRP の阻害剤ではない。ベルパタスビルは吸収過程での GI 内濃度で P-gp 及び BCRP を阻害する可能性があり、これらトランスポーターの基質を併用投与した場合、その吸収に影響を及ぼす。配合錠として投与した場合、ベルパタスビルによる GI での P-gp 及び BCRP の阻害により、ソホスブビルの血漿中曝露は高くなる。GI 内における BCRP の阻害は、臨床薬物相互作用試験でロスバスタチン濃度が上昇したことの主要な機序と考えられた。

ソホスブビル及びベルパタスビルが肝臓又は全身の循環中でトランスポーターを介した薬物相互作用を生じる可能性は低い。ソホスブビル、その主要代謝物である GS-331007 及びベルパタスビルは、臨床での血漿中濃度で、腎トランスポーターの OCT2、OAT1、OAT3 及び MATE1 を阻害しない。ソホスブビル及びその主要代謝物である GS-331007 は、臨床での血漿中濃度で、肝臓で発現するトランスポーターの OCT1、OATP1B1、OATP1B3、MRP2 又は BSEP を阻害しない。ベルパタスビルは肝トランスポーターの MRP2、NTCP、OCT1 及び OATP1A2 の臨床的に意義ある阻害剤ではない。ベルパタスビルは *in vitro* 試験で OATP1B1 及び OATP1B3 の阻害剤であることが明らかにされ、臨床薬物相互作用試験でプラバスタチン濃度をわずかに上昇させた。

10　図表

図表は本文中の適切な場所に記載した。

ソホスブビル／ベルパタスビル

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.5 薬物動態試験概要表

ギリアド・サイエンシズ株式会社

目次

頁
1 薬物動態試験：一覧表 5
1.1 ベルパタスビル 5
1.2 ソホスフビル／ベルパタスビル 11
2 分析方法及びバリデーション試験（ベルパタスビル） 12
3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（ベルパタスビル） 13
3.1 AD-281-2028：CD-1 マウスでのベルパタスビルの薬物動態 13
3.2 AD-281-2034：001178-W（野生型）マウスでのベルパタスビルの薬物動態 15
3.3 AD-281-2002：ラットでのベルパタスビルの薬物動態 16
3.4 AD-281-2014：ラットに用量漸増単回経口投与後のベルパタスビルの薬物動態 18
3.5 AD-281-2020：ラットに単回経口投与後のベルパタスビルの薬物動態―投与媒体の検討― 19
3.6 AD-281-2032：雌ウサギでのベルパタスビルの薬物動態 20
3.7 AD-281-2035：雌ウサギに単回経口投与後のベルパタスビルの薬物動態―投与媒体の検討― 21
3.8 AD-281-2036：雌ウサギでのベルパタスビルの薬物動態 22
3.9 AD-281-2003：イヌでのベルパタスビルの薬物動態 23
3.10 AD-281-2013：イヌでのベルパタスビルの薬物動態 25
3.11 AD-281-2004：サルでのベルパタスビルの薬物動態 26
4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（ベルパタスビル） 28
5 薬物動態試験：分布（ベルパタスビル） 29
5.1 AD-281-2021：CD-1 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布 29
5.2 AD-281-2018：Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布 34
5.3 AD-281-2018：Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布 39
5.4 AD-281-2038：雌ニュージーランド白色ウサギでのベルパタスビルの薬物動態 44
6 薬物動態試験：タンパク結合（ベルパタスビル） 46
6.1 AD-281-2037：マウスでのベルパタスビルの血漿タンパク結合 46
6.2 AD-281-2001：ラット、イヌ、アカゲザル、カニクイザル及びヒトでのベルパタスビルの血漿タンパク結合 47
6.3 AD-281-2029：ヒトでのベルパタスビルの血漿タンパク結合 48
7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験（ベルパタスビル） 49
7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行 49
8 薬物動態試験：その他の分布試験 61
9 薬物動態試験：代謝：*In vitro*（ベルパタスビル） 62
9.1 AD-281-2039：CD-1 マウスの肝ミクロソームを用いたベルパタスビルの *in vitro* 代謝安定性 62

9.2 AD-281-2006：肝ミクロソーム及びヒト肝細胞を用いたベルパタスビルの代謝安定性 63
9.3 AD-281-2007：ベルパタスビルの代謝に関与する CYP 分子種の同定 64
10 薬物動態試験：代謝：*In vivo*（ベルパタスビル） 65
10.1 AD-281-2022：CD-1 マウス及び rasH2 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング 65
10.2 マウスでのベルパタスビルの推定代謝経路 68
10.3 AD-281-2019：ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング 69
10.4 ラットでのベルパタスビルの推定代謝経路 75
10.5 AD-281-2024：イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング 76
10.6 イヌでのベルパタスビルの推定代謝経路 82
11 薬物動態試験：推定代謝経路（ベルパタスビル） 83
12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 84
12.1 ソホスブビル 84
12.1.1 AD-334-2010：CYP 阻害剤及び HIV 阻害薬のソホスブビル代謝への影響 84
12.1.2 AD-334-2026：ソホスブビルによる CYP 阻害 85
12.2 ベルパタスビル 86
12.2.1 AD-281-2008：ベルパタスビルによる CYP 阻害 86
12.2.2 AD-281-2016：ベルパタスビルによる UGT1A1 阻害 87
12.2.3 AD-281-2009：ベルパタスビルの *in vitro* での AhR 及び PXR への影響 88
12.2.4 AD-281-2025：ヒト培養肝細胞でのベルパタスビルによる誘導作用 89
13 薬物動態試験：排泄（ベルパタスビル） 92
13.1 AD-281-2021：マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄 92
13.2 AD-281-2018：胆管カニューレ処置 Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄 94
13.3 AD-281-2023：胆管カニューレ処置イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄 97
13.4 AD-281-2005：胆管カニューレ処置ラットにベルパタスビルを静脈内投与後の排泄 100
14 薬物動態試験：排泄：胆汁中（ベルパタスビル） 101
15 薬物動態試験：薬物相互作用 102
15.1 ソホスブビル 102
15.1.1 AD-334-2002：他剤によるソホスブビル膜透過性への影響を評価する *in vitro* 試験 102
15.1.2 AD-334-2023：高濃度のソホスブビルによる P-gp への阻害を評価する *in vitro* 試験 103
15.1.3 AD-334-2024：高濃度の GS-331007 による P-gp、OCT1、OCT2、MATE1、OAT3、BSEP 及び MRP2 に対する阻害を評価する *in vitro* 試験 104
15.1.4 AD-334-2025：ヒト肝細胞を用いたソホスブビル又は GS-331007 のイリノテカン代謝への影響 106

15.2 ベルパタスビル 107
15.2.1 AD-281-2010 : ベルパタスビルによる *in vitro* での OATP1B1、OATP1B3、P-gp 及び BCRP 阻害 107
15.2.2 AD-281-2040 : ベルパタスビルによる *in vitro* での OATP1A2 及び OATP2B1 阻害 109
15.2.3 AD-281-2011 : ベルパタスビルが *in vitro* での OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるかどうかの検討 110
15.2.4 AD-281-2041 : ベルパタスビルが *in vitro* での P-gp 及び BCRP の基質であるかどうかの検討 111
15.2.5 AD-281-2012 : ベルパタスビルによる *in vitro* での MRP2、BSEP 及び NTCP 阻害 112
15.2.6 AD-281-2026 : ベルパタスビルによる *in vitro* での OAT1、OAT3、OCT2 及び MATE1 阻害 113
15.2.7 AD-281-2026 : ベルパタスビルが *in vitro* での OCT1 の基質／阻害剤となるかどうかの検討 114
16 薬物動態試験：その他 115

1 薬物動態試験：一覧表

1.1 ベルパタスビル

Test Articles: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)
Analytical Methods and Validation: Velpatasvir					
Partial Method Validation	No	Mouse Plasma	*In Vitro*	[redacted]	BA-281-2007 (8298450)
Method Validation	No	Rat Plasma	*In Vitro*	[redacted]	BA-281-2002 (8259478)
Partial Method Validation	No	Rabbit Plasma	*In Vitro*	[redacted]	BA-281-2004 (8271133)
Method Validation	No	Dog Plasma	*In Vitro*	[redacted]	BA-281-2003 (8259479)
Absorption: Velpatasvir					
Single Dose Pharmacokinetics	No	CD-1 Mouse	Oral	[redacted]	AD-281-2028 (8290-403)
Single Dose Pharmacokinetics	No	001178-W Mouse	Oral	[redacted]	AD-281-2034 (8295116)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Rat	IV, Oral	[redacted]	AD-281-2002 (8249-103)

1.1 ベルパタスビル（続き）

Test Articles: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Rat	Oral	[redacted]	AD-281-2014 (8249-119, 8249-691, 8249-089, 8249-693)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Rat	Oral	[redacted]	AD-281-2020 (8249-119)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Rabbit	Oral	[redacted]	AD-281-2032 (8266-615)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Rabbit	Oral	[redacted]	AD-281-2035 (8266-614)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Rabbit	Oral	[redacted]	AD-281-2036 (8244-398, 8266-612)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Dog	IV, Oral	[redacted]	AD-281-2003 (M231.785-02)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Dog	Oral	[redacted]	AD-281-2013 (8250-962, 814-1271)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Cynomolgus Monkey	IV, Oral	[redacted]	AD-281-2004 (814-1114)

1.1 ベルパタスビル（続き）

Test Articles: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)
Distribution: Velpatasvir					
Plasma Protein Binding	No	Plasma (Mouse)	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-281-2037
Plasma Protein Binding	No	Plasma (Rat, Dog, Monkey and Human)	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc. and [redacted]	AD-281-2001 (60D-1140)
Plasma Protein Binding	No	Plasma (Human)	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-281-2029
Tissue Distribution of Radioactivity	No	Mouse (CD-1)	Oral	[redacted]	AD-281-2021 (8276146)
Tissue Distribution of Radioactivity	No	Rat (Sprague-Dawley and Long Evans)	Oral	[redacted]	AD-281-2018 (8267445)
Tissue Distribution of Radioactivity	No	Pregnant and Lactating Rat	Oral	[redacted]	AD-281-2031 (8300-383)
Single Dose Pharmacokinetics	No	Rabbit	IV	[redacted]	AD-281-2038 (8266-616)

1.1 ベルパタスビル（続き）

Test Articles: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)
Metabolism: Velpatasvir					
Metabolic Stability	No	Liver Microsomes (CD-1 Mouse)	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-281-2039
Metabolic Stability	No	Liver Microsomes (Rat, Dog, Monkey and Human); Human Hepatocytes	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-281-2006
Cytochrome P450 Phenotyping	No	Human CYP Enzymes	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2007 (CYP0174-R179)
Metabolite Identification and Profiling of Radioactivity	No	Mouse (CD-1 and rasH2 Transgenic)	Oral	[redacted]	AD-281-2022 (8276147)
Metabolite Identification and Profiling of Radioactivity	No	Rat	Oral	[redacted]	AD-281-2019 (8267446)
Metabolite Identification and Profiling of Radioactivity	No	Dog	Oral	[redacted]	AD-281-2024 (8276149)
Excretion: Velpatasvir					
Excretion of Radioactivity	No	CD-1 Mouse	Oral	[redacted]	AD-281-2021 (8276146)
Excretion of Radioactivity	No	Rat (Sprague-Dawley and Long Evans)	Oral	[redacted]	AD-281-2018 (8267445)

1.1 ベルパタスビル（続き）

Test Articles: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)
Excretion of Radioactivity	No	Dog	Oral	[redacted]	AD-281-2023 (8276148)
Biliary Excretion	No	Rat	IV	[redacted]	AD-281-2005 (BG-0114-DA-RE)
Pharmacokinetic Drug Interactions: Velpatasvir					
Cytochrome P450 Inhibition	No	Human Liver Microsomes	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2008 (CYP 174-R180)
UGT1A1 Inhibition	No	Human UGT1A1	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2016 (CYP 174-R117)
Activation of Nuclear Receptors	No	Human AhR and PXR in Reporter Cell Lines	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2009 (GIL-201112-104)
Induction of Metabolism Enzymes and Transporters	No	Cultured Human Hepatocytes	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2025 (440002800)
Transporter Inhibition	No	P-gp-, BCRP-, OATP1B1-, or OATP1B3-Overexpressing Cells	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-281-2010
Transporter Inhibition	No	OATP1A2- or OATP2B1-overexpressing cells	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2040 (Gilead-82-22Aug2014)

1.1 ベルパタスビル（続き）

Test Articles: VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)
OATP1B1 and OATP1B3 Substrate	No	Human OATP1B1- or OATP1B3-Overexpressing CHO Cells	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-281-2011
P-gp and BCRP Substrate	No	P-gp- or BCRP-Overexpressing Cells	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-281-2041
Inhibition of MRP2, BSEP, and NTCP	No	Transfected Cells and Membrane Vesicles	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2012 (XT-369 & XT-347)
Transporter Inhibition	No	OAT1-, OAT3-, OCT1-, OCT2-, and MATE1-Expressing Cells	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2026 ([redacted]-Gilead-57-23 Mar2013)
OCT1 Substrate	No	Transfected Cells	*In Vitro*	[redacted]	AD-281-2026 ([redacted]-Gilead-57-23 Mar2013)
Other Pharmacokinetic Studies: Velpatasvir					
None					

a An entry of "Yes" indicates that the study report includes a GLP compliance statement.
AhR = aryl hydrocarbon receptor; BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP = bile salt export pump; CHO = Chinese hamster ovary; CYP = cytochrome P450; IV = intravenous; MATE = multidrug and toxin extrusion protein; MDCKII = Madin-Darby canine kidney cell line; MRP = multidrug resistance protein; NTCP = solute carrier (SLC) uptake transporter sodium/taurocholate cotransporting polypeptide; P-gp = P-glycoprotein; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion-transporting polypeptide; OCT = organic cation transporter; PXR = pregnane X receptor; UGT = UDP glucuronosyl transferase; VEL = velpatasvir (GS-5816)

1.2 ソホスフビル／ベルパタスビル

Test Articles: SOF, VEL

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Gilead Study No. (CRO Study No.)
Analytical Methods and Validation: Sofosbuvir/Velpatasvir: Not applicable					
Absorption: Sofosbuvir/Velpatasvir: Not applicable					
Distribution: Sofosbuvir/Velpatasvir: Not applicable					
Metabolism: Sofosbuvir/Velpatasvir: Not applicable					
Excretion: Sofosbuvir/Velpatasvir: Not applicable					
Pharmacokinetic Drug Interactions: Sofosbuvir and Sofosbuvir/Velpatasvir					
Hepatocyte Metabolism	No	Human	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-334-2010
Cytochrome P450 Inhibition	No	Human	*In Vitro*	[redacted]	AD-334-2026 (174-R278)
Permeability Across Caco-2 Monolayers	No	Human	*In Vitro*	[redacted]	AD-334-2002 (11GILEP17, 12GILEP1)
Transporter Inhibition	No	Human	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-334-2023
Transporter Transfected Cells and Membrane Vesicles Inhibition	No	Human	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-334-2024
Hepatocyte Metabolism	No	Human	*In Vitro*	Gilead Sciences, Inc.	AD-334-2025
Other Pharmacokinetic Studies: Sofosbuvir/Velpatasvir: None					

SOF = sofosbuvir; VEL = velpatasvir
a An entry of "Yes" indicates that the study report includes a GLP compliance statement.

2　　分析方法及びバリデーション試験（ベルパタスビル）

Type of Study	Test Articles	GLP[a]	Test System	Analytical Method	Testing Facility	Study Number (CRO Study No.)
Partial Method Validation	VEL	No	K_2 EDTA Mouse Plasma	LC-MS/MS	[redacted]	BA-281-2007 (8298450)
Method Validation	VEL	No	K_2 EDTA Rat Plasma	LC-MS/MS	[redacted]	BA-281-2002 (8259478)
Partial Method Validation	VEL	No	K_2 EDTA Rabbit Plasma	LC-MS/MS	[redacted]	BA-281-2004 (8271133)
Method Validation	VEL	No	K_2 EDTA Dog Plasma	LC-MS/MS	[redacted]	BA-281-2003 (8259479)

K_2EDTA = potassium ethylenediaminetetraacetic acid; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; VEL = velpatasvir (GS-5816)
a　　An entry of "Yes" indicates that the study report includes a GLP compliance statement.

3　薬物動態試験：単回投与後の吸収（ベルパタスビル）

3.1　AD-281-2028：CD-1 マウスでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Ascending Oral Doses to Male CD-1 Mice	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2028

Species/Strain	CD-1 Mice			
Sex/ No. of Animals	M/12	M/12	M/12	M/12
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	0.2% Tween 20, 0.2% HPMC and 99.6% (w/w) water			
Method of Administration	Oral	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	30	100	300	1000
Analyte	VEL	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS

3.1 AD-281-2028：CD-1 マウスでのベルパタスビルの薬物動態（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Ascending Oral Doses to Male CD-1 Mice	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2028

PK Parameters				
Dose (mg/kg)	30	100	300	1000
T_{max} (h)	3.00	4.00	4.00	8.00
C_{max} (ng/mL)	4010	7430	10500	17400
AUC (ng•h/mL)	37100	81700	176000	249000
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (ng/mL) [a]	41.6 ± NC	461 ± 419	3520 ± 3370	1750 ± 940

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{24h} = measured concentration at 24 h postdose; C_{max} = maximum plasma concentration; HPMC = hydroxyl propyl methylcellulose; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; nonfasted = animals had access to Certified Rodent Diet; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L
a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals.

3.2 AD-281-2034：001178-W（野生型）マウスでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title			**Study Type**		**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Ascending Oral Doses to 001178-W (wild type) Mice			Single-Dose Pharmacokinetics		VEL	AD-281-2034
Species/Strain	001178-W [Wild, CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic] Mice					
Sex/ No. of Animals	M/9	F/9	M/9	F/9	M/9	F/9
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	0.2% Tween 20, 0.2% HPMC and 99.6% (w/w) water					
Method of Administration	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	100	100	300	300	1000	1000
Analyte	VEL	VEL	VEL	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters						
T_{max} (h)	4	4	4	8	12	12
C_{max} (ng/mL)	8570	11500	9960	11100	14000	17200
AUC (ng•h/mL)	107000	112000	156000	180000	223000	266000
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (ng/mL)	333	30.7	1210	156	2680	2660

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{24h} = measured concentration at 24 h postdose; C_{max} = maximum plasma concentration; F= Female; HPMC = hydroxypropyl methylcellulose; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; nonfasted = animals had access to Certified Rodent Diet #2016C (Harlan) ad libitum; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L

3.3 AD-281-2002：ラットでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Sprague Dawley Rats	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2002

Species/Strain	Sprague-Dawley Rats	
Sex/ No. of Animals	M/3	M/3
Feeding Condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	5% ethanol, 35% PEG 400, 60% water (pH 2.0)	5% ethanol, 55% PEG 400, 40% citrate buffer (pH 2.2)
Method of Administration	Intravenous Infusion	Oral
Sample	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	1	2
Analyte	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS

3.3 AD-281-2002：ラットでのベルパタスビルの薬物動態（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Sprague Dawley Rats	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2002

PK Parameters[a]		
Method of Administration	Intravenous Infusion	Oral
T_{max} (h)	0.48 ± 0.00	1.0 ± 0.0
C_{max} (nmol/L)	1210 ± 433	116 ± 53
AUC (nmol/L•h)	1310 ± 239	670 ± 435
(time for calculation – h)	0-24	0-24
AUC_{inf} (nmol/L•h)	1320 ± 240	709 ± 478
$t_{1/2}$ (h)	2.36 ± 0.26	2.33 ± 0.38
(time for calculation – h)	8-24	8-24
CL (L/h/kg)	0.94 ± 0.19	NA
V_{ss} (L/kg)	1.61 ± 0.31	NA
Bioavailability (%)	NA	27.7 ± 18.7

AUC = area under the plasma concentration-time curve; CL = total systemic plasma clearance; C_{max} = maximum plasma concentration; fasted = animals were fasted overnight prior to dose administration and up to 4 hours after dosing; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; NA = not applicable; PEG400 = polyethylene glycol 400; PK = pharmacokinetic; $t_{1/2}$ = estimated elimination half-life; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; V_{ss} = steady-state volume of distribution; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals. Conversion- VEL: 1 nmol/L = 0.883 ng/mL

3.4 AD-281-2014：ラットに用量漸増単回経口投与後のベルパタスビルの薬物動態

Report Title			**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Ascending Oral Doses in Sprague-Dawley Rats			Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2014
Species/Strain	Sprague-Dawley Rats					
Sex/ No. of Animals	M/3	M/3	M/3	M/3	M/3	M/3
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	15% Solutol HS 15, 45% PG, 40% Water (pH 2)					
Method of Administration	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	10	30	75	150	300	600
Analyte	VEL	VEL	VEL	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters[a]						
T_{max} (h)	2.67 ± 1.15	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	10.0 ± 3.46	10.7 ± 2.31
C_{max} (ng/mL)	190 ± 40	510 ± 110	1000 ± 310	1310 ± 60	1620 ± 570	1250 ± 230
AUC (ng•h/mL)	1460 ± 110	5680 ± 1460	9540 ± 960	17000 ± 2240	24100 ± 8200	18700 ± 1800
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (ng/mL)	2.48 ± NC	8.67 ± 2.76	8.68 ± 1.70	25.9 ± 6.6	200 ± 164	110 ± 92

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{24h} = measured concentration at 24 h postdose; C_{max} = maximum plasma concentration; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; nonfasted = animals had access to Certified Rodent Diet # 2016C *ad libitum*; PG = propylene glycol; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L
a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals.

3.5 AD-281-2020：ラットに単回経口投与後のベルパタスビルの薬物動態—投与媒体の検討—

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Oral Doses in Various Formulations in Sprague-Dawley Rats	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2020

Species/Strain	Sprague-Dawley Rats					
Sex/ No. of Animals	M/3	M/3	M/3	M/3	M/3	M/3
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	Formulation 1[a]		Formulation 2[b]		Formulation 3[c]	
Method of Administration	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	10	30	10	30	10	30
Analyte	VEL	VEL	VEL	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters[d]						
T_{max} (h)	2.7 ± 1.2	4.0 ± 3.5	7.3 ± 4.2	8.7 ± 3.1	4.7 ± 1.2	4.7 ± 1.2
C_{max} (nmol/L)	223 ± 52	581 ± 125	106 ± 13	410 ± 51	218 ± 57	549 ± 112
AUC (nmol/L•h)	1648 ± 126	6431 ± 1654	1155 ± 413	4943 ± 1720	1649 ± 351	4676 ± 979
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (nmol/L)	2.81 ± NC	9.82 ± 3.13	24.5 ± NC	7.76 ± 3.99	5.37 ± 3.23	6.87 ± 3.42

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{24h} = measured concentration at 24 h postdose; Capmul MCM NF = mixture of monoacylglycerols; C_{max} = maximum plasma concentration; HPMC = hydroxypropyl methylcellulose; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; nonfasted = animals had access to Certified Rodent Diet # 2016C *ad libitum*; PG = propylene glycol; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L and 1 nmol/L= 0.883 ng/mL

a Vehicle was 15% Solutol HS 15, 45% PG, and 40% water, pH 2.0
b Vehicle was 0.2% HPMC, 0.2% Tween 20, and 0.9% benzyl alcohol in water
c Vehicle was 100% Capmul MCM NF
d Values are the mean ± standard deviation from 3 animals

3.6 AD-281-2032：雌ウサギでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Ascending Oral Doses in Female New Zealand White Rabbits	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2032

Species/Strain	New Zealand White Rabbits			
Sex/ No. of Animals	F/3	F/3	F/3	F/3
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	0.5% HPMC, 0.1% Tween 20, 0.9% benzyl alcohol, and 98.5% water			
Method of Administration	Oral	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	100	300	600	1000
Analyte	VEL	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters[a]				
T_{max} (h)	2.7 ± 1.2	4.0 ± 2.0	8.0 ± NC	6.7 ± 5.0
C_{max} (ng/mL)	133 ± 34	115 ± 40	225 ± NC	134 ± 50
AUC (ng•h/mL)	710 ± 216	980 ± 305	2870 ± NC	2080 ± 929
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (ng/mL)	7.6 ± 3.7	23.0 ± 17.3	98.7 ± NC	90.2 ± 41.1

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{24h} = measured concentration at 24 h postdose; C_{max} = maximum plasma concentration; F= female; HPMC = hydroxyl propyl methylcellulose; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L
a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals

3.7 AD-281-2035：雌ウサギに単回経口投与後のベルパタスビルの薬物動態—投与媒体の検討—

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following a Single Oral Dose in Various Formulations to Rabbits	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2035

Species/Strain	New Zealand White Rabbits		
Sex/ No. of Animals	F/4	F/4	F/4
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	Formulation 1[a]	Formulation 2[b]	Formulation 3[c]
Method of Administration	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	600	600	600
Analyte	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters[d]			
T_{max} (h)	10.0 ± 9.4	5.5 ± 1.0	4.0 ± 1.6
C_{max} (ng/mL)	61.3 ± 12.1	148 ± 40	246 ± 75
AUC (ng•h/mL)	987 ± 228	2150 ± 809	3280 ± 903
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (ng/mL)	51.5 ± 15.6	74.4 ± 26.4	128 ± 48

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{24h} = measured concentration at 24 h postdose; C_{max} = maximum plasma concentration; F= female; HPMC = hydroxyl propyl methylcellulose; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Vehicle was 100% oleic acid
b Vehicle was 60% propylene glycol and 40% Solutol HS-15
c Vehicle was 0.5% HPMC, 0.1% Tween 20, 0.9% benzyl alcohol, and 98.5% water
d Values are the mean ± standard deviation from 4 animals. Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L

3.8 AD-281-2036：雌ウサギでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Ascending Oral Doses in Solution to Rabbits	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2036

Species/Strain	New Zealand White Rabbits		
Sex/ No. of Animals	F/3	F/3	F/3
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	25% Solutol HS-15 and 75% PG		
Method of Administration	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	100	300	600
Analyte	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters[a]			
T_{max} (h)	2.3 ± 1.5	4.0 ± 2.0	4.7 ± 1.2
C_{max} (ng/mL)	135 ± 59	240 ± 265	239 ± 176
AUC (ng•h/mL)	904 ± 595	2640 ± 3360	1980 ± 703
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (ng/mL)	8.42 ± NC	40.5 ± 47.5	57.5 ± 21.6

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; F= female; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; PG = propylene glycol; PK = pharmacokinetic; C_{24h} = measured concentration at 24 h postdose; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L
a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals

3.9 AD-281-2003：イヌでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Beagle Dogs	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2003

Species/Strain	Beagle Dogs	
Sex/ No. of Animals	M/3	M/3
Feeding Condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	5% ethanol, 35% PEG 400 and 60% water (pH 2.0)	5% ethanol, 55% PEG 400 and 40% citrate buffer (pH 2.2)
Method of Administration	Intravenous Infusion	Oral
Sample	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	0.25	0.5
Analyte	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS

3.9 AD-281-2003：イヌでのベルパタスビルの薬物動態（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Beagle Dogs	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2003

PK Parameters[a]		
Method of Administration	Intravenous Infusion	Oral
T_{max} (h)	0.48 ± 0.00	1.3 ± 0.6
C_{max} (nmol/L)	448 ± 157	71.3 ± 27.2
AUC (nmol/L•h)	931 ± 217	490 ± 252
(time for calculation – h)	0-24	0-24
AUC_{inf} (nmol/L•h)	1010 ± 187	585 ± 343
$t_{1/2}$ (h)	5.51 ± 0.46	9.14 ± 5.11
(time for calculation – h)	8-24	8-24
CL (L/h/kg)	0.25 ± 0.04	NA
V_{ss} (L/kg)	1.46 ± 0.43	NA
Bioavailability (%)	NA	25.0 ± 12.9

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; CL = total systemic plasma clearance; fasted = animals were fasted overnight prior to dose administration and up to 4 hours after dosing; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; NA = not applicable; PEG400 = polyethylene glycol 400; PK = pharmacokinetic; $t_{1/2}$ = estimated elimination half-life; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816); V_{ss} = steady-state volume of distribution
Conversion- VEL: 1 nmol/L = 0.883 ng/mL
a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals.

3.10 AD-281-2013：イヌでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title			**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 Following Single Ascending Oral Doses in Beagle Dogs			Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2013
Species/Strain	Beagle Dogs				
Sex/ No. of Animals	M/3	M/3	M/3	M/3	M/3
Feeding Condition	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted	Nonfasted
Vehicle/Formulation	15 % Solutol HS-15, 45% PG, 40 % Water (pH 2)				
Method of Administration	Oral	Oral	Oral	Oral	Oral
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	3	10	30	100	200
Analyte	VEL	VEL	VEL	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters[a]					
T_{max} (h)	3.33 ± 1.15	2.00 ± 0.00	10.0 ± 12.2	6.67 ± 4.62	10.7 ± 11.5
C_{max} (ng/mL)	255 ± 155	394 ± 146	974 ± 162	1240 ± 130	1140 ± 510
AUC (ng•h/mL)	1450 ± 800	2200 ± 360	10300 ± 1240	14800 ± 1400	8650 ± 1490
(time for calculation – h)	0-24	0-24	0-24	0-24	0-24
C_{24h} (ng/mL)	6.03 ± NC	3.65 ± NC	514 ± 415	80.9 ± 39.6	205 ± 318

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; fasted = animals were fasted overnight prior to dose administration and up to 4 hours after dosing; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; NC = not calculated; nonfasted = animals had access to noncertified Canine Diet #2027C (Harlan); PG = propylene glycol; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L
a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals.

3.11 AD-281-2004：サルでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Cynomolgus Monkeys	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2004

Species/Strain	Cynomolgus Monkeys	
Sex/ No. of Animals	M/3	M/3
Feeding Condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	5% ethanol, 35% PEG400, 60% water (pH 2.0)	5% ethanol, 55% PEG400, 40% citrate buffer (pH 2.2)
Method of Administration	Intravenous Infusion	Oral
Sample	Plasma	Plasma
Dose (mg/kg)	0.5	1.0
Analyte	VEL	VEL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS

3.11 AD-281-2004：サルでのベルパタスビルの薬物動態（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Cynomolgus Monkeys	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2004

PK Parameters[a]		
Method of Administration	Intravenous Infusion	Oral
T_{max} (h)	0.40 ± 0.13	3.33 ± 1.15
C_{max} (nmol/L)	897 ± 275	157 ± 25
AUC (nmol/L•h)	1960 ± 766	1220 ± 122
(time for calculation – h)	0-24	0-24
AUC_{inf} (nmol/L•h)	2080 ± 705	1280 ± 123
$t_{1/2}$ (h)	4.18 ± 3.65	5.49 ± 0.20
(time for calculation – h)	4-24	4-24
CL (L/h/kg)	0.30 ± 0.09	NA
V_{ss} (L/kg)	1.58 ± 0.62	NA
Bioavailability (%)	NA	29.7 ± 2.8

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; CL = total systemic plasma clearance; fasted = animals were fasted overnight prior to dose administration and up to 4 hours after dosing; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; M = male; NA = not applicable; PEG400 = polyethylene glycol 400; PK = pharmacokinetic; $t_{1/2}$ = estimated elimination half-life; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816); V_{ss} = steady-state volume of distribution
Conversion- VEL: 1 nmol/L = 0.883 ng/mL
a Values are the mean ± standard deviation from 3 animals.

4　　薬物動態試験：反復投与後の吸収（ベルパタスビル）

反復投与後の吸収については、毒性試験の一部として反復経口投与後のベルパタスビルの TK プロファイルで評価した。結果は 2.6.7 項に示す。

- マウス（2.6.7.7.1 項；TX-281-2028、2.6.7.13.1 項；TX-281-2032）
- ラット（2.6.7.7.2 項；TX-281-2003、2.6.7.7.3 項；TX-281-2007）
- ウサギ（2.6.7.11 項；TX-281-2010、2.6.7.13.3 項；TX-281-2014）
- イヌ（2.6.7.7.4 項；TX-281-2004、2.6.7.7.5 項；TX-281-2008）

5 薬物動態試験：分布（ベルパタスビル）

5.1 AD-281-2021：CD-1 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Mice	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2021

Species	CD-1 Mouse
Gender (M/F)/No. of Animals	M/9 (one animal per time point)
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	45% PG, 15% kolliphor HS 15, and 40% reverse osmosis water (pH 2.0)
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	20 mg/kg (200 µCi/kg)
Specific Activity	56.0 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	9.75 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/ Liquid Scintillation Counting

5.1 AD-281-2021：CD-1 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Mice	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2021

	Tissue Concentration of Radioactivity in CD-1 Mice (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)								
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**3 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Adrenal gland(s)	ND[a]	ND[a]	4490	2460[b]	175	ND	ND	ND	ND
Arterial wall	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bile	NR	2800	34200	24700	4280	1070	223	BLQ	ND
Blood	688	379	3260	2490	288	ND	ND	ND	ND
Bone	BLQ	BLQ	406	369	BLQ	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	607	391	6330	3950	336	ND	ND	ND	ND
Brain cerebellum	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	BLQ	BLQ	103	238	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain choroid plexus	ND	ND	2310	3010	ND	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	BLQ	BLQ	163	154	BLQ	ND	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	156	ND	5670	5080	1620	ND	ND	ND	ND
Cecum	ND	ND	3430	3460	1210	ND	ND	ND	ND
Diaphragm	419	265	8150	3270	423	ND	ND	ND	ND
Epididymis	ND	ND	889	2020	410	373	ND	ND	ND
Esophagus	131	128	6010	2020	515	ND	ND	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	ND	BLQ	5040	5290	626	BLQ	ND	ND	ND

5.1 AD-281-2021：CD-1 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Mice	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2021

	Tissue Concentration of Radioactivity in CD-1 Mice (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)								
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**3 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Eye lens	ND	ND	127	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Eye uveal tract	ND	ND	1810	2090	240	ND	ND	ND	ND
Eye(s)	ND	ND	777	636	BLQ	ND	ND	ND	ND
Fat (abdominal)	ND	BLQ	2680	1410	259	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	355	187	10200	6480	320	134	ND	ND	ND
Gall bladder	NR	1300	61000	62800	8310	1230	163	107	ND
Harderian gland	298	204	17300	16600	1610	560	ND	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	ND	ND	5990	5830	768	ND	ND	ND	ND
Kidney cortex	1880	1270	18000	11100	1520	503	ND	ND	ND
Kidney medulla	1500	1150	14000	9280	1100	317	ND	ND	ND
Kidney(s)	1690	1160	15900	10100	1310	388	ND	ND	ND
Large intestine	ND	ND	4490	3270	328	519	ND	ND	ND
Liver	4790	2250	31600	21600	3840	1540	469	341	210
Lung(s)	875	343	7590	3870	286	ND	ND	ND	ND
Lymph node(s)	ND	ND	1550	2320	386	ND	ND	ND	ND
Meninges	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Muscle	BLQ	BLQ	3170	1530	132	ND	ND	ND	ND

5.1 AD-281-2021：CD-1 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Mice	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2021

	Tissue Concentration of Radioactivity in CD-1 Mice (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)								
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**3 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Myocardium	439	178	7200	3090	182	ND	ND	ND	ND
Nasal turbinates	ND	59100[c]	731	2000	171	239	ND	ND	ND
Pancreas	389	238	9330	6890	476	186	ND	ND	ND
Pituitary gland	522	147	7660	4420	331	ND	ND	ND	ND
Preputial gland	ND	ND	1990	4420	927	716	ND	ND	ND
Prostate gland	ND	ND	1640	1500	591	ND	ND	ND	ND
Salivary gland(s)	228	162	7990	5660	393	155	ND	ND	ND
Salivary gland(s), parotid	345	195	9200	5750	416	ND	ND	ND	ND
Seminal vesicle(s)	ND	ND	730	908	816	382	ND	ND	ND
Skin (nonpigmented)	ND	ND	1470	1350	320	BLQ	ND	ND	ND
Small intestine	ND	ND	9010	5220	694	ND	ND	ND	ND
Spinal cord	ND	ND	BLQ	109	ND	ND	ND	ND	ND
Spleen	1130	340	6470	3070	241	109	ND	ND	ND
Stomach	ND[a]	ND[a]	3540	3340	302	ND	ND	ND	ND
Stomach mucosa	ND[a]	ND[a]	4420	4580	ND	ND	ND	ND	ND
Stomach wall	ND[a]	ND[a]	1890	2610	ND	ND	ND	ND	ND
Testis(es)	ND	ND	1080	2390	950	504	BLQ	ND	ND

5.1 AD-281-2021：CD-1 マウスに[^{14C}]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Mice	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2021

	Tissue Concentration of Radioactivity in CD-1 Mice (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)								
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**3 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Testis(es)	ND	ND	1080	2390	950	504	BLQ	ND	ND
Thymus	ND	ND	1480	1910	305	ND	ND	ND	ND
Thyroid	561	287	8160	3960	327	ND	ND	ND	ND
Urinary bladder	ND	ND	4510	4710	638	ND	ND	ND	ND
Urine	522	ND	1250	2540	159	ND	ND	ND	ND

BLQ = below the limit of quantitation (< 101 ng Equivalents [^{14}C]VEL/g); h = hours; ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue); nonfasted = animals had access to certified food ad libitum; NR = not represented (tissue not present in section); PG = propylene glycol; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Tissue was not detectable due to flare from the gastrointestinal contents

b Tissue appeared to be fat-soaked

c Tissue may have been contaminated with test material during dose administration

5.2 AD-281-2018：Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

Species	Sprague-Dawley Rat
Gender (M/F)/No. of Animals	M/10 (one animal per time point)
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	45% PG, 15% Solutol HS-15, and 40% reverse osmosis (RO) water (pH 2.0)
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	30 mg/kg (100 µCi/kg)
Specific Activity	56.0 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	3.42 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid Scintillation Counting

5.2 AD-281-2018：Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Sprague-Dawley Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33410	**B33411**	**B33412**	**B33413**	**B33414**	**B33415**	**B33416**	**B33417**	**B33418**	**B33419**
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Adrenal gland(s)	ND[a]	ND[a]	4320	8580	4320	3640	BLQ	ND	ND	ND
Arterial wall	ND	ND	ND	1780	2010	2330	965	ND	ND	ND
Bile	ND	23700	27200	34300	32000	13500	ND	ND	ND	ND
Blood	ND	387	374	616	344	BLQ	ND	ND	ND	ND
Bone	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	ND	623	1390	2750	1890	783	BLQ	ND	ND	ND
Brain cerebellum	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	ND	481	1160	2550	2340	NR	ND	ND	ND	ND
Cecum	ND	383	794	1410	ND[b]	2680	308	BLQ	ND	ND
Diaphragm	ND	483	1280	2100	1650	662	BLQ	ND	ND	ND
Epididymis	ND	ND	BLQ	BLQ	405	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Esophagus	BLQ	958	689	2260	1230	508	ND	ND	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	ND	BLQ	461	1270	1570	1100	BLQ	ND	ND	ND

5.2 AD-281-2018：Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Sprague-Dawley Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33410	**B33411**	**B33412**	**B33413**	**B33414**	**B33415**	**B33416**	**B33417**	**B33418**	**B33419**
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Eye lens	ND	ND	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Eye uveal tract	ND	ND	ND	ND	628	460	BLQ	ND	ND	ND
Eye(s)	ND	ND	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Fat (abdominal)	ND	BLQ	BLQ	407	612	302	BLQ	ND	ND	ND
Fat (brown)	ND	563	2370	4270	2670	1200	BLQ	ND	ND	ND
Harderian gland	ND	ND	387	1300	2510	2910	2070	511	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	ND	ND	ND	950	1240	1200	BLQ	ND	ND	ND
Kidney cortex	647	1810	4460	6300	3730	1400	323	ND	ND	ND
Kidney medulla	505	1470	4350	7230	4850	2000	293	ND	ND	ND
Kidney(s)	596	1610	4410	6920	4330	1610	328	BLQ	ND	ND
Large intestine	ND	ND	664	1560	1410	1830	544	BLQ	ND	ND
Liver	1700	5080	9000	11900	5990	1840	304	BLQ	ND	ND
Lung(s)	ND	650	966	1490	932	288	BLQ	ND	ND	ND
Lymph node(s)	ND	ND	557	1270	1440	1030	ND	ND	ND	ND
Muscle	ND	BLQ	529	1230	1380	559	BLQ	ND	ND	ND

5.2 AD-281-2018：Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Sprague-Dawley Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33410	**B33411**	**B33412**	**B33413**	**B33414**	**B33415**	**B33416**	**B33417**	**B33418**	**B33419**
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Myocardium	ND	748	1620	2460	1840	650	BLQ	ND	ND	ND
Nasal turbinates	ND	ND	BLQ	373	894	624	BLQ	ND	ND	ND
Pancreas	ND	1180	2100	4430	2940	1570	BLQ	ND	ND	ND
Pituitary gland	ND	399	1530	2250	1980	802	ND	ND	ND	ND
Preputial gland	ND	ND	504	977	1080[c]	1880[c]	515	454	ND	ND
Prostate gland	ND	ND	BLQ	900	1150	676	BLQ	ND	ND	ND
Salivary gland(s)	ND	610	1730	3520	2650	1110	BLQ	ND	ND	ND
Seminal vesicle(s)	ND	ND	BLQ	BLQ	337	320	BLQ	ND	ND	ND
Skin (nonpigmented)	ND	ND	334	611	732	634	BLQ	ND	ND	ND
Small intestine	2730	ND[b]	1250	5280	4380	2510	BLQ	BLQ	ND	ND
Spinal cord	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Spleen	ND	1090	1870	2770	1740	709	BLQ	ND	ND	ND
Stomach	ND	ND	1400	2270	1530	474	BLQ	ND	ND	ND
Stomach mucosa	ND	ND	1320	2650	1480	375	ND	ND	ND	ND
Stomach wall	ND	ND	915	2250	942	1490	ND	ND	ND	ND
Testis(es)	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	333	BLQ	ND	ND	ND

5.2 AD-281-2018：Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Sprague-Dawley Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33410	**B33411**	**B33412**	**B33413**	**B33414**	**B33415**	**B33416**	**B33417**	**B33418**	**B33419**
Tissues/Organs	**0.5 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Thymus	ND	BLQ	334	992	1220	1260	BLQ	ND	ND	ND
Thyroid	ND	1000	2360	4270	2600	1030	457	ND	ND	ND
Urinary bladder	ND	BLQ	511	687	1170	592	ND	ND	ND	ND
Urine	1130	1030	2380	2620	489	383	ND	ND	ND	ND

BLQ = below the limit of quantitation (< 287 ng equivalents ^{14}C-VEL/g); h = hours; ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue); nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; NR = not represented (tissue not present in section); PG = propylene glycol; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Not detectable due to flare from stomach contents
b Not detectable due to flare from gastrointestinal contents
c Tissue appeared fat-soaked

5.3 AD-281-2018：Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

Species	Long Evans Rat
Gender (M/F)/No. of Animals	M/10 (one animal per time point)
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	45% PG, 15% Solutol HS-15, and 40% reverse osmosis (RO) water (pH 2.0)
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	30 mg/kg (100 μCi/kg)
Specific Activity	56.0 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	3.42 μCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid Scintillation Counting

5.3 AD-281-2018：Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Long Evans Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33420	**B33421**	**B33422**	**B33423**	**B33424**	**B33425**	**B33426**	**B33427**	**B33428**	**B33429**
Tissues/Organs	**0.50 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Adrenal gland(s)	382	3720[a]	7000	9390	2970	672	BLQ	ND	ND	ND
Arterial wall	ND	ND	ND	ND	989	618	323	ND	ND	ND
Bile	8090	15900	36100	31700	6540	ND	ND	ND	ND	ND
Blood	BLQ	419	574	580	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Bone	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	ND	960	1610	2130	738	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain cerebellum	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	ND	ND	1700	2260	1250	ND	ND	ND	ND	ND
Cecum	ND	669	1080	1350	1800	ND[b]	BLQ	ND	ND	ND
Diaphragm	BLQ	775	1390	2040	691	BLQ	ND	ND	ND	ND
Epididymis	ND	ND	BLQ	321	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Esophagus	BLQ	540	706	1010	546	BLQ	ND	ND	ND	ND

5.3 AD-281-2018：Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Long Evans Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33420	**B33421**	**B33422**	**B33423**	**B33424**	**B33425**	**B33426**	**B33427**	**B33428**	**B33429**
Tissues/Organs	**0.50 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Exorbital lacrimal gland	ND	376	719	1810	1020	474	BLQ	ND	ND	ND
Eye lens	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND
Eye uveal tract	ND	ND	972	1800	1870	1730	2090	1550	1450	1310
Eye(s)	ND	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	293	BLQ	BLQ	BLQ
Fat (abdominal)	ND	BLQ	BLQ	492	415	BLQ	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	ND	1080	1320	2330	1200	ND	ND	ND	ND	ND
Harderian gland	ND	654	521	1380	1230	1150	1190	352	BLQ	ND
Intra-orbital lacrimal gland	ND	ND	353	1850	968	424	ND	ND	ND	ND
Kidney cortex	525	4220	4930	4790	1840	553	BLQ	ND	ND	ND
Kidney medulla	384	2950	4720	5410	2400	525	BLQ	ND	ND	ND
Kidney(s)	475	3730	4740	4960	2000	545	BLQ	ND	ND	ND
Large intestine	ND	565	851	1510	1250	2200	1280	BLQ	ND	ND
Liver	2280	8590	10400	10500	3110	610	471	BLQ	ND	ND
Lung(s)	BLQ	993	1010	1570	341	BLQ	ND	ND	ND	ND
Lymph node(s)	ND	BLQ	495	1070	675	ND	ND	ND	ND	ND

5.3 AD-281-2018：Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Long Evans Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33420	**B33421**	**B33422**	**B33423**	**B33424**	**B33425**	**B33426**	**B33427**	**B33428**	**B33429**
Tissues/Organs	**0.50 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Muscle	ND	435	625	1210	578	BLQ	ND	ND	ND	ND
Myocardium	BLQ	1110	1690	2240	657	BLQ	ND	ND	ND	ND
Nasal turbinates	ND	BLQ	BLQ	762	343	BLQ	ND	ND	ND	ND
Pancreas	ND	1520	2810	3310	1260	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Pituitary gland	ND	1320	1870	2170	836	ND	ND	ND	ND	ND
Preputial gland	ND	ND	324[a]	434[a]	345[a]	343	BLQ	ND	ND	ND
Prostate gland	ND	BLQ	BLQ	773	403	794	BLQ	ND	ND	ND
Salivary gland(s)	ND	1270	2410	3180	1070	BLQ	ND	ND	ND	ND
Seminal vesicle(s)	ND	BLQ	BLQ	332	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Skin (nonpigmented)	ND	BLQ	348	646	377	BLQ	ND	ND	ND	ND
Skin (pigmented)	ND	BLQ	342	663	425	BLQ	ND	ND	ND	ND
Small intestine	1690	1310	5890	4130	4430	1260	BLQ	ND	ND	ND
Spinal cord	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Spleen	350	1840	2140	2250	857	BLQ	ND	ND	ND	ND
Stomach	ND[c]	ND[c]	1550	1720	687	BLQ	ND	ND	ND	ND

5.3 AD-281-2018：Long Evans ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを単回経口投与後の分布（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

	Tissue Concentration of Radioactivity in Long Evans Rats (ng Equivalents [^{14}C]VEL/g Tissue)									
	B33420	**B33421**	**B33422**	**B33423**	**B33424**	**B33425**	**B33426**	**B33427**	**B33428**	**B33429**
Tissues/Organs	**0.50 h**	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**96 h**	**168 h**
Stomach mucosa	ND[c]	ND[c]	1750	2320	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Stomach wall	ND[c]	ND[c]	867	969	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Testis(es)	ND	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Thymus	ND	BLQ	337	822	692	375	BLQ	ND	ND	ND
Thyroid	ND	1650	2630	3150	949	ND	ND	ND	ND	ND
Urinary bladder	ND	BLQ	667	986	678	ND	ND	ND	ND	ND
Urine	812	1750	3380	3970	NR	BLQ	ND	ND	ND	ND

BLQ = below limit of quantitation (< 287 ng equivalents [^{14}C]VEL/g); h=hours; nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue NR = not represented (tissue not present in section); PG = propylene glycol; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Tissue appeared fat-soaked

b Not detectable due to flare from gastrointestinal contents

c Tissue is not detectable due to flare from stomach contents

5.4 AD-281-2038：雌ニュージーランド白色ウサギでのベルパタスビルの薬物動態

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Female New Zealand White Rabbits	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2038
Species/Strain	New Zealand White Rabbits		
Sex/ No. of Animals	F/4		
Feeding Condition	Fasted		
Vehicle/Formulation	5% ethanol, 75% PEG 300 and 20% water (pH 2.0)		
Method of Administration	Intravenous Infusion		
Sample	Plasma		
Dose (mg/kg)	5.0		
Analyte	VEL		
Assay	LC-MS/MS		

5.4 AD-281-2038：雌ニュージーランド白色ウサギでのベルパタスビルの薬物動態（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Female New Zealand White Rabbits	Single-Dose Pharmacokinetics	VEL	AD-281-2038
PK Parameters[a]			
T_{max} (h)	0.48 ± 0.00		
C_{max} (ng/mL)	8940 ± 614		
AUC (ng•h/mL)	11600 ± 2380		
(time for calculation – h)	0-24		
AUC_{inf} (ng•h/mL)	11800 ± 2560		
$t_{1/2}$ (h)	5.05 ± 1.14		
(time for calculation – h)	8-24		
MRT (h)	3.64 ± 0.78		
CL (L/h/kg)	0.44 ± 0.09		
V_{ss} (L/kg)	1.55 ± 0.22		

AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; CL = total systemic plasma clearance; F= female; fasted = animals were fasted overnight prior to dose administration and up to 4 hours after dosing; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; MRT = mean residence time; PEG300 = polyethylene glycol 300; PK = pharmacokinetic; $t_{1/2}$ = estimated elimination half-life; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816); V_{ss} = steady-state volume of distribution
Conversion- VEL: 1 ng/mL = 1.13 nmol/L
a Values are the mean ± standard deviation from 4 animals.

6 薬物動態試験：タンパク結合（ベルパタスビル）

6.1 AD-281-2037：マウスでのベルパタスビルの血漿タンパク結合

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro CD-1 Mouse Plasma Protein Binding Determination of GS-5816 Protein Binding by Equilibrium Dialysis	Distribution	VEL	AD-281-2037

Study System:	Plasma from CD-1 mice	
Method:	Equilibrium Dialysis at 37°C for 3 hours with VEL final concentration at 2 µmol/L	
	VEL Concentration[a] at 2 µmol/L	
Species	**Unbound[b] (%)**	**Bound (%)**
Mouse	< 0.1	> 99.9

VEL = velpatasvir (GS-5816)
a Initial concentration in protein-containing cell
b Mean values from 2 determinations

6.2 AD-281-2001：ラット、イヌ、アカゲザル、カニクイザル及びヒトでのベルパタスビルの血漿タンパク結合

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Protein Binding Determination of GS-5816 by Equilibrium Dialysis	Distribution	VEL	AD-281-2001

Study System:	Plasma from Sprague-Dawley rats, beagle dogs, rhesus monkey, cynomolgus monkeys, and human	
Method:	Equilibrium Dialysis at 37°C for 3 hours with VEL concentration at 2 µmol/L[a]	
	VEL	
Species	**Unbound[b] (%)**	**Bound (%)**
Rat	0.22 ± 0.03	99.78 ± 0.03
Dog	0.19 ± 0.02	99.81 ± 0.02
Rhesus Monkey	0.28 ± 0.01	99.72 ± 0.01
Cynomolgus Monkeys	0.41 ± 0.07	99.59 ± 0.07
Human	0.30 ± 0.02	99.70 ± 0.02
Study System:	Competitive equilibrium dialysis of VEL in human plasma vs in CCM[c]	
Method:	Competitive equilibrium dialysis conducted at 37ºC with opposing dialysis cells containing 100% human plasma or CCM. Both matrices were spiked with VEL to a final concentration of 2 µmol/L. The dialysis was continued for 24 h with gentle rotation.	
Human plasma/CCM ratio[d]	52	

VEL = velpatasvir (GS-5816)
a Initial concentration in protein-binding cell
b Values are mean ± standard deviation from 3 determinations
c CCM= Cell Culture Medium (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) containing 10% (v/v) fetal bovine serum
d Mean value of 2 determinations

6.3 AD-281-2029：ヒトでのベルパタスビルの血漿タンパク結合

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Human Plasma Binding Determination of GS-5816 by Equilibrium Dialysis	Distribution	VEL	AD-281-2029

Study System:	Plasma from humans
Method:	Equilibrium dialysis at 37°C for 3 hours with VEL concentration at 0.1, 0.25, 0.5, 1, and 2 µmol/L

VEL Concentration[a] (µmol/L)	**VEL Unbound[b] (%)**	**VEL Bound (%)**
0.10	0.49 ± 0.09	99.51 ± 0.09
0.25	0.29 ± 0.08	99.71 ± 0.08
0.50	0.29 ± 0.07	99.71 ± 0.07
1.00	0.38 ± 0.01	99.62 ± 0.01
2.00	0.47 ± 0.00	99.53 ± 0.00

VEL = velpatasvir (GS-5816)
a Initial concentration in protein-binding cell
b Values are mean ± standard deviation from 2 determinations

7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験（ベルパタスビル）

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

Placental Transfer						
Species	Sprague-Dawley Rats					
Gestation Day / No. of Animals	13 / 5					
Feeding Condition	Nonfasted					
Vehicle/Formulation	15% Kolliphor HS 15, 45% PG and 40% reverse osmosis water (pH 2.0)					
Method of Administration	Oral Gavage					
Dose	30 mg/kg (100 µCi/kg)					
Specific Activity	56.7 mCi/mmol					
Specific Activity of Formulation	3.06 µCi/mg					
AnalyteAssay	Carbon-14/Liquid Scintillation Counting					
Time (h)	1, 2, 4, 8, 24 h postdose					
	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)					
Tissue	**1 h**	**2h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**	
Maternal Plasma	883	973	716	408	BLQ	
Blood	590	621	444	260	BLQ	

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Adrenal gland(s)	7860	7240	6280	3420	ND
Amniotic fluid	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Amniotic sac	646	666	744	1250	1040
Arterial wall	954	965	1570	1320	ND
Bile	26100	44900	32900	28100	ND
Blood	768	804	564	BLQ	ND
Bone	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Bone marrow	1500	2050	1780	1110	ND
Brain cerebellum	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Brain cerebrum	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Brain choroid plexus	791	1730	1800	879	ND
Brain medulla	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Brain olfactory lobe	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Cecum	1450	1470	3360	5490	1240
Diaphragm	994	1690	1590	964	ND
Esophagus	1330	1710	2340	3380	ND

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Exorbital lacrimal gland	486	1020	1310	784	ND
Eye lens	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Eye uveal tract	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Eye(s)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Fat (abdominal)	BLQ	BLQ	332	333	ND
Fat (brown)	2120	3310	2500	1520	ND
Fetal adrenal gland(s)	NR	NR	NR	NR	NR
Fetal blood	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal brain	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal eye(s)	NR	NR	NR	NR	NR
Fetal gastrointestinal tract	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal kidney(s)	NR	NR	NR	NR	NR
Fetal liver	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal lung(s)	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal muscle	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal myocardium	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal spinal cord	NR	NR	NR	NR	NR

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Fetus	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Harderian gland	357	624	1380	2010	1080
Intra-orbital lacrimal gland	452	766	1160	644	ND
Kidney cortex	3900	5530	3470	2550	BLQ
Kidney medulla	2790	3920	2520	1660	BLQ
Kidney(s)	3090	4420	3140	2160	BLQ
Large intestine	806	948	2120	1190	504
Liver	8290	9860	5940	4130	ND
Lung(s)	1060	1480	1070	561	ND
Mammary gland	502	777	1010	637	ND
Muscle	322	513	692	540	ND
Myocardium	1530	2100	1580	980	ND
Nasal turbinates	BLQ	BLQ	BLQ	377	BLQ
Ovary(ies)	334[a]	460[a]	487[a]	391[a]	ND[a]
Pancreas	1790	3240	2860	2100	BLQ
Pituitary gland	1420	2570	1640	1340	ND

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Placenta	683	580	581	406	BLQ
Preputial gland	637	782[a]	2120	1300	571
Salivary gland(s)	1140	2240	2110	1640	ND
Skin (nonpigmented)	BLQ	321	378	331	ND
Small intestine	824	6730	6930	6340	BLQ
Spinal cord	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Spleen	2220	2360	1860	1200	ND
Stomach	1360	1860	1630	776	ND
Thymus	335	614	871	1050	ND
Thyroid	1880	2370	1920	1270	ND
Urinary bladder	1320	1190	1370	644	ND
Urine	7880	4450	4530	1400	ND
Uterus	338	550	977	862	BLQ

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

Placental Transfer					
Species	Sprague-Dawley Rats				
Gestation Day / No. of Animals	18 / 5				
Feeding Condition	Nonfasted				
Vehicle/Formulation	15% Kolliphor HS 15, 45% PG and 40% water (pH 2.0)				
Method of Administration	Oral Gavage				
Dose	30 mg/kg (100 μCi/kg)				
Specific Activity	56.7 mCi/mmol				
Specific Activity of Formulation	3.06 μCi/mg				
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid Scintillation Counting				
Time (h)	1, 2, 4, 8, 24 h postdose				
	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Maternal Plasma	967	613	1150	80.4	BLQ
Blood	640	404	711	65.4	BLQ

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

Assay:	Quantitative Whole Body Autoradiography
Time (h):	1, 2, 4, 8, 24 h postdose

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Adrenal gland(s)	ND[b, c]	6260	11200	1880	ND
Amniotic fluid	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Amniotic sac	366	499	785	520	329
Arterial wall	ND	724	1320	370	BLQ
Bile	26600	29200	27000	7700	ND
Blood	775	496	899	BLQ	ND
Bone	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Bone marrow	1220	1220	2800	BLQ	ND
Brain cerebellum	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Brain cerebrum	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Brain choroid plexus	1560	1490	2240	ND	ND
Brain medulla	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Brain olfactory lobe	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Cecum	592	451	3690	5640	2510
Diaphragm	893	871	2600	BLQ	ND

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Esophagus	970	1170	1750	343	ND
Exorbital lacrimal gland	BLQ	494	1530	523	ND
Eye lens	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Eye uveal tract	BLQ	BLQ	570	BLQ	ND
Eye(s)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Fat (abdominal)	BLQ	BLQ	516	BLQ	BLQ
Fat (brown)	759	1200	3380	542	ND
Fetal adrenal gland(s)	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal blood	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal brain	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal eye(s)	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal gastrointestinal tract	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal kidney(s)	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal liver	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal lung(s)	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal muscle	ND	ND	ND	ND	ND
Fetal myocardium	ND	ND	ND	ND	ND

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Fetal spinal cord	ND	ND	ND	ND	ND
Fetus	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Harderian gland	463	360	1350	1250	961
Intra-orbital lacrimal gland	BLQ	445	1380	643	ND
Kidney cortex	3420	3250	6370	732	ND
Kidney medulla	2590	2860	4690	561	ND
Kidney(s)	3060	3100	5130	639	ND
Large intestine	1350	499	1600	738	2240
Liver	7170	5620	10600	427	ND
Lung(s)	1370	933	1980	BLQ	ND
Mammary gland	478	559	1840	327	ND
Muscle	BLQ	BLQ	1080	BLQ	ND
Myocardium	1660	1310	3210	BLQ	ND
Nasal turbinates	BLQ	BLQ	381	BLQ	BLQ
Ovary(ies)	BLQ[c]	BLQ[c]	657[c]	BLQ[c]	ND[c]
Pancreas	1560	1830	4990	639	BLQ
Pituitary gland	1880	1230	3190	BLQ	ND

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

	[^{14}C]VEL Concentration (ng eq/g)				
Tissue	**1 h**	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Placenta	962	727	1580	BLQ	BLQ
Preputial gland	ND	661	3390	1030	551
Salivary gland(s)	1090	1340	3800	652	ND
Skin (nonpigmented)	BLQ	BLQ	455	BLQ	BLQ
Small intestine	3250	5240	8300	1340	BLQ
Spinal cord	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	ND
Spleen	1900	1570	3410	BLQ	BLQ
Stomach	2110	2900	3050	BLQ	ND
Thymus	424	420	1500	681	BLQ
Thyroid	1770	1910	2910	340	ND
Urinary bladder	1780	327	2140	BLQ	ND
Urine	5360	1490	8570	BLQ	ND
Uterus	480	381	1230	BLQ	BLQ

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

Excretion into Milk

Species	Sprague-Dawley Rats
Postpartum Day / No. of Animals	9 or 10 / 15
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	15% Kolliphor HS 15, 45% PG and 40% reverse osmosis water (pH 2.0)
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	30 mg/kg (100 µCi/kg)
Specific Activity	56.7 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	3.06 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid Scintillation Counting

	[^{14}C]VEL PK Parameters[d]				
Tissue/Matrix	**T_{max} (h)**	**C_{max} (ng eq/g)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{0-24} (ng eq·h/g)**	**C_{24h} (ng eq/g)**
Blood	2	457	2.01	1959	ND
Plasma	2	742	1.85	3198	ND
Milk	4	988	NC	5553	ND

7.1 AD-281-2031：ラットでの[^{14}C]ベルパタスビルの胎盤通過及び乳汁移行（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Placental Transfer and Lacteal Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Administration of a Single Oral Dose to Pregnant and Lactating Rats	Distribution	[^{14}C]VEL	AD-281-2031

Analyte	Carbon 14				
Assay	Liquid Scintillation Counting				
Time (h)	1, 2, 4, 8, 24 h postdose				
Concentration Ratios of Radioactivity	**1 h**	**2h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**
Blood to plasma	0.596 ± 0.012	0.615 ± 0.011	0.608 ± 0.027	0.741 ± 0.096	NA
Milk to plasma	0.422 ± 0.047	1.15 ± 0.16	2.40 ± 0.59	6.48 ± 0.88	NA

$AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24 h postdose; BLQ = below the limit of quantitation (< 320 ng equivalents [^{14}C]VEL/g); C_{24h} = plasma concentration at 24 h postdose; C_{max} = maximum plasma concentration; eq = equivalents [^{14}C]-GS-5816; h = hours; NA = not applicable NC= not calculated due to insufficient data; ND = not detectable (sample shape not discernable from background or surrounding tissue); nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; NR = not represented (tissue not present in section); PG = propylene glycol; PK = pharmacokinetic; T_{max} = time to reach the maximum plasma concentration; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Tissue appeared to be fat-soaked
b ND due to smear from gastrointestinal contents
c Tissue appeared to be fat-soaked
d Values are the mean ± standard deviation from 3 animals

8　　薬物動態試験：その他の分布試験

該当なし。

9 薬物動態試験：代謝：*In vitro*（ベルパタスビル）

9.1 AD-281-2039：CD-1 マウスの肝ミクロソームを用いたベルパタスビルの *in vitro* 代謝安定性

Report Title		**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Metabolic Stability of GS-5816 in Hepatic Microsomal Fraction from CD-1 Mice		Metabolism	VEL	AD-281-2039
Method:	Metabolic stability in hepatic microsomal fractions from CD-1 mice. VEL (3 µmol/L) was incubated in duplicate over 65 min at 37°C in mouse liver microsomal fraction (0.5 mg/mL) in the presence of an NADPH regenerating system.			
Species	**$t_{1/2}$ (min)**	**Predicted Hepatic Clearance (L/h/kg)**	**Predicted Hepatic Extraction (%)**	
CD-1 Mouse	272	0.98	18.2	

VEL = velpatasvir (GS-5816)

9.2 AD-281-2006：肝ミクロソーム及びヒト肝細胞を用いたベルパタスビルの代謝安定性

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Metabolic Stability of GS-5816 in Hepatic Subcellular Fractions from Human, Dog, Rat and Monkey and in Cryopreserved Human Hepatocytes	Metabolism	VEL	AD-281-2006

Study System:	Hepatic Microsomal Fraction from Rat, Dog, Monkey, and Human. VEL (3 μmol/L) was incubated in duplicate over 60 min at 37°C in liver microsomal fraction (0.5 mg/mL) in the presence of an NADPH regenerating system.		
Species	***In Vitro* $t_{1/2}$ (min)**	**Predicted Hepatic Clearance (L/h/kg)**	**Predicted Hepatic Extraction (%)**
Rat	192	0.743	17.7
Dog	163	0.369	20.5
Cynomolgus monkey	>395	< 0.17	< 10.6
Human	>395	< 0.17	< 12.7
Study System:	Human Cryopreserved Hepatocytes. VEL (2 μmol/L) was incubated in duplicate over 6 h at 37°C in human hepatocyte (1×10^6 cells/mL)		
Species	***In Vitro* $t_{1/2}$ (h)**	**Predicted Hepatic Clearance (L/h/kg)**	**Predicted Hepatic Extraction (%)**
Human	> 39.5	< 0.07	< 5.1

VEL = velpatasvir (GS-5816)

9.3 AD-281-2007：ベルパタスビルの代謝に関与する CYP 分子種の同定

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Cytochrome P450 Metabolic Reaction Phenotyping of GS-5816	Metabolism	VEL	AD-281-2007

Study System:	VEL metabolic phenotyping using CYP bactosomes						
	Metabolism Rate (min^{-1})						
Compound	**CYP1A2**	**CYP2B6**	**CYP2C8**	**CYP2C9**	**CYP2C19**	**CYP2D6**	**CYP3A4**
VEL	< 0.12	0.13	1.26	< 0.47	< 0.12	< 0.23	2.09
(% Positive Control)	(< 0.8%)	(6.6%)	(5.5%)	(< 2.2%)	(< 12%)	(< 1.0%)	(18%)
Ethoxycoumarin	14.2	-	-	-	-	-	-
Efavirenz	-	1.97[a]	-	-	-	-	-
Amodiaquine	-	-	23.1	-	-	-	-
Diclofenac	-	-	-	21.5	-	-	-
Diazepam	-	-	-	-	0.96[b]	-	-
Dextromethorphan	-	-	-	-	-	22.8	-
Testosterone	-	-	-	-	-	-	11.5

VEL = velpatasvir (GS-5816)
a Efavirenz is a selective substrate for CYP2B6
b Diazepam is a selective substrate for CYP2C19

10　薬物動態試験：代謝：*In vivo*（ベルパタスビル）

10.1　AD-281-2022：CD-1 マウス及び rasH2 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples from Mice after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2022

Study System:	Metabolite profiling of [^{14}C]VEL in plasma, urine, and feces of male CD-1 and rasH2 transgenic mice following a 20 mg/kg oral dose	
	Metabolite Profile in Plasma from CD-1 Mice	
Compound	**$AUC_{0\text{-}12h}$ (ng eq•h/g)**	**% of Total in Plasma**
M16	1121	2.70
M19	2982	7.10
M23	7146	17.0
VEL	29813	70.8
Total in plasma	42116	100
	Metabolite Profile in Plasma from rasH2 Mice	
Compound	**$AUC_{0\text{-}8h}$ (ng eq•h/g)**	**% of Total in Plasma**
VEL	19778	92.0
Total in plasma	21505	100

10.1 AD-281-2022：CD-1 マウス及び rasH2 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples from Mice after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2022

	Metabolite Profile in Urine from CD-1 Mice	
	% Administered Dose by Collection Interval	
Compound	**0-24 h**	**% of Total in Urine**
M2	0.00720	3.75
M3	0.0420	21.9
M6	0.0355	18.5
M8	0.0196	10.2
M10	0.0246	12.8
M11	0.0129	6.72
M25	0.00993	5.17
Total in Urine	0.192	100

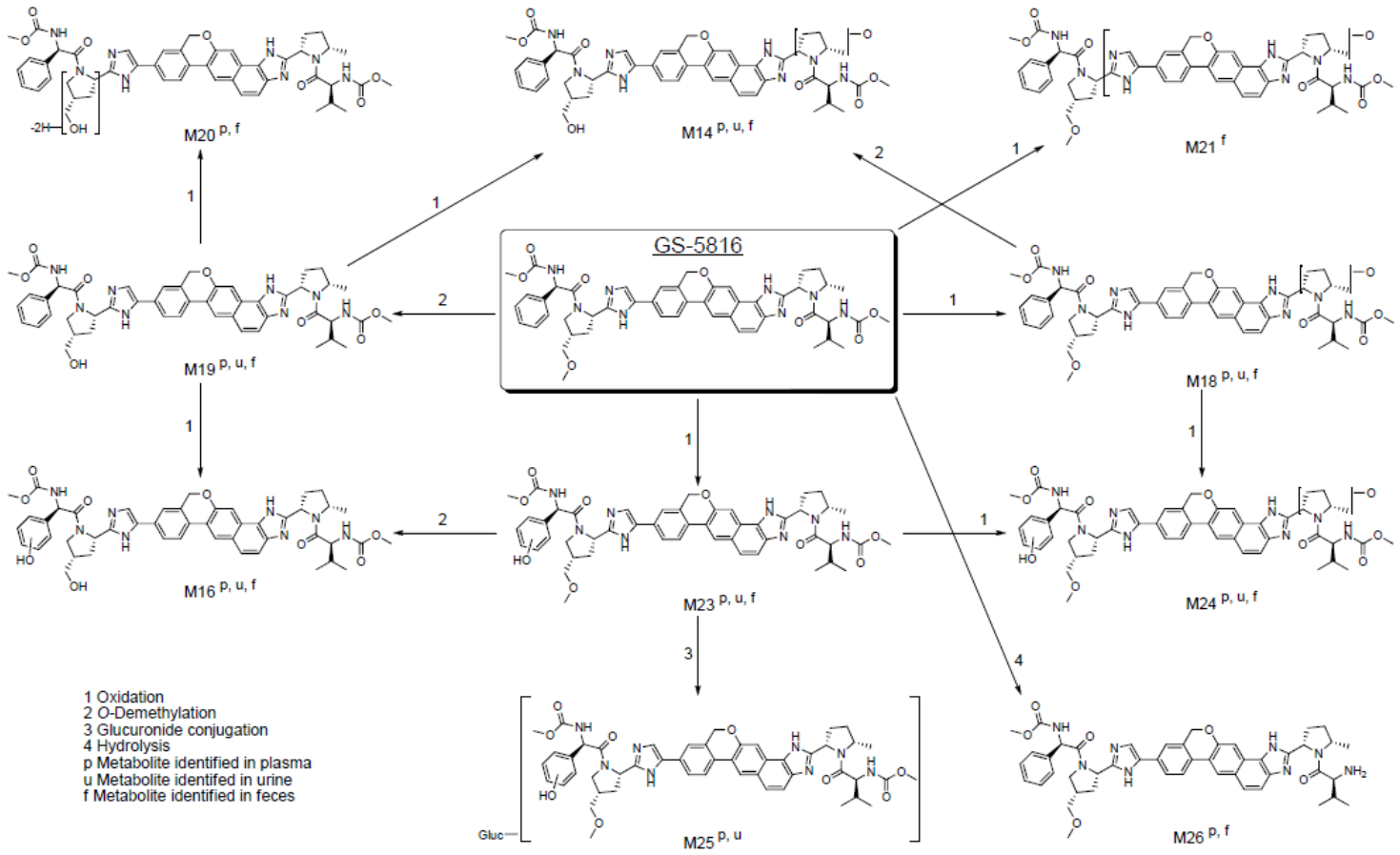
10.1 AD-281-2022：CD-1 マウス及び rasH2 マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, and Feces Samples from Mice after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2022

	Metabolite Profile in Feces from CD-1 Mice	
	% Administered Dose by Collection Interval	
Compound	**0-24 h**	**% of Total in Feces**
M24	1.13	1.22
M16	2.27	2.45
M18	1.59	1.72
M19	4.37	4.72
M23	6.71	7.25
VEL	63.6	68.8
Total in Feces	92.5	100

$AUC_{0\text{-}8h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero to 8 h postdose; $AUC_{0\text{-}12h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero to 12 h postdose; eq = equivalents [^{14}C]-GS-5816; M16 = desmethyl-hydroxy-VEL-2; M19 = desmethyl-VEL; M23 = hydroxy-VEL-3; M25 = hydroxy-VEL-glucuronide; M24 = dihydroxy-VEL-1; M18 = hdroxy-VEL-1; VEL = velpatasvir (GS-5816)

10.2 マウスでのベルパタスビルの推定代謝経路



10.3 AD-281-2019：ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Rats after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2019

Study System:	Metabolite profiling of [^{14}C]VEL in plasma, urine, bile, and feces of bile duct intact and bile duct-cannulated male Sprague-Dawley rats following a 30 mg/kg oral dose	
	Metabolite Profile in Plasma from Intact Sprague-Dawley Rats	
Compound	**$AUC_{0\text{-}12h}$ (ng eq •h/g)**	**% of Total in Plasma**
M1	15.1	0.18
M18	103	1.24
M19	688	8.27
VEL	6885	82.7
Total in Plasma	8322	100

10.3 AD-281-2019：ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Rats after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2019

	Metabolite Profile in Urine from Male Bile Duct-Intact Rats	
	% Administered Dose by Collection Interval	
Compound	**0-24 h**	**% of Total in Urine**
M1	0.00495	2.45
M2	0.0116	5.74
M3	0.0740	36.6
M4	0.00872	4.32
M5	0.0452	22.4
M6	0.0170	8.42
M7	0.00447	2.21
M8	0.0104	5.15
M9	0.00471	2.33
M10	0.0134	6.63
Total in Urine	0.202	100

10.3 AD-281-2019：ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	Study Type	Test Article	Report Number
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Rats after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2019

	Metabolite Profile in Urine from Male Bile Duct-Cannulated Rats	
	% Administered Dose by Collection Interval	
Compound	0-24 h	% of Total in Urine
M1	ND	ND
M2	0.0105	4.59
M3	0.0627	27.4
M4	0.00843	3.68
M5	0.0376	16.4
M6	0.0180	7.86
M7	0.0116	5.07
M8	0.0141	6.16
M9	0.00593	2.59
M10	0.0157	6.86
M14	0.00525	2.29
M16	0.00341	1.49
M18	0.00638	2.79
M19	0.00662	2.89
Total in Urine	0.229	100

10.3　AD-281-2019：ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Rats after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2019

	Metabolite Profile in Bile from Bile Duct-Cannulated Sprague-Dawley Rats				
	% Administered Dose by Collection Interval				**% of Total in Bile**
Compound	**0-8 h**	**8-24 h**	**24-48 h**	**Sum (0-48 h)**	
M11	0.0490	ND	ND	0.0490	0.37
M12	0.126	0.180	0.0150	0.321	2.41
M13	0.145	0.175	0.00971	0.330	2.48
M14	0.509	0.582	0.0677	1.16	8.72
M15	0.0979	0.156	0.0194	0.273	2.05
M16	0.302	0.465	0.0527	0.820	6.17
M17	0.0490	0.0548	0.00652	0.110	0.83
M18	0.694	1.05	0.242	1.99	15.0
M19	1.48	3.52	0.501	5.50	41.4
M20	0.188	ND	ND	0.188	1.41
M23	0.0669	0.158	0.0334	0.258	1.94
VEL	0.360	0.839	0.349	1.55	11.7
Total in bile	4.38	7.63	1.33	13.3	100

10.3 AD-281-2019：ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Rats after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2019

	Metabolite Profile in Feces from Intact Sprague-Dawley Rats			
	% Administered Dose by Collection Interval			
Compound	**0-24 h**	**24-48 h**	**Sum (0-48 h)**	**% of Total in Feces**
M14	0.657	0.0510	0.708	0.73
M18	2.53	0.156	2.68	2.77
M19	4.96	0.476	5.44	5.62
M20	0.620	0.0643	0.684	0.71
M21	0.894	0.0561	0.950	0.98
M22	0.839	0.0536	0.893	0.92
VEL	76.7	4.10	80.8	83.5
Total in feces	91.2	5.61	96.8	100

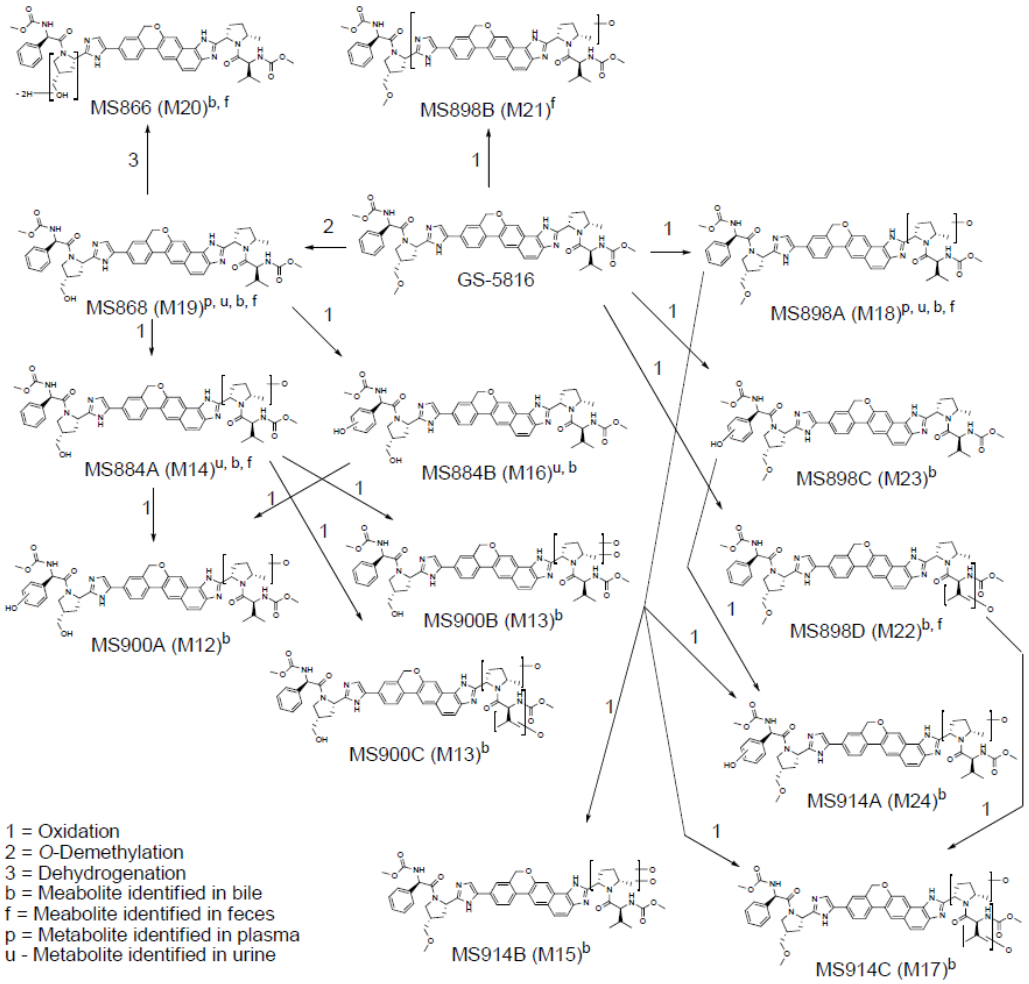
10.3 AD-281-2019：ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Rats after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2019

	Metabolite Profile in Feces from Bile Duct-Cannulated Sprague-Dawley Rats			
	% Administered Dose by Collection Interval			
Compound	**0-24 h**	**24-48 h**	**Sum (0-48 h)**	**% of Total in Feces**
M14	ND	ND	ND	ND
M18	1.14	0.0436	1.18	1.42
M19	0.543	0.123	0.666	0.80
M20	0.184	ND	0.184	0.22
M21	0.949	0.0306	0.979	1.18
M22	0.321	ND	0.321	0.39
VEL	71.2	2.75	74.0	89.1
Total in feces	79.6	3.45	83.1	100

$AUC_{0\text{-}12h}$ = area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last quantifiable concentration (at 12 h postdose); eq = equivalents [^{14}C]-GS-5816; M12 = desmethyl-dihydroxy-VEL-1; M13 = desmethyl-dihydroxy-VEL-2/ desmethyl-dihydroxy-VEL-3; M14 = desmethyl-hydroxy-VEL-1; M15 = dihydroxy-VEL-2; M16 = desmethyl-hydroxy-VEL-2; M17 = dihydroxy-VEL-3; M18 = hydroxy-VEL-1; M19 = desmethyl-VEL; M20 = desmethyl-dehydro-VEL; M21 = hydroxy-VEL-2; M22 = hydroxy-VEL-4; M23 = hydroxy-VEL-3; M24 = dihydroxy-VEL-1; other metabolites were not identifiable due to low concentration; ND = peak not detected or below the established limit of quantitation; VEL = velpatasvir (GS-5816)

10.4　　ラットでのベルパタスビルの推定代謝経路



10.5 AD-281-2024：イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Dogs after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2024

Study System:	Metabolite profiling of [^{14}C]VEL in plasma, urine, bile, and feces of bile duct-intact and bile duct-cannulated male beagle dogs following a 10 mg/kg oral dose	
	Metabolite Profile in Plasma from Bile Duct-Intact Dogs	
Compound	**$AUC_{0\text{-}8h}$ (ng eq •h/g)**	**% of Total in Plasma**
M18	172	3.10
M19	691	12.4
VEL	4522	81.0
Total in plasma	5580	100

10.5 AD-281-2024：イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Dogs after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2024

	Metabolite Profile in Urine from Bile Duct-Intact Dogs	
	% Administered Dose by Collection Interval	
Compound	**0-24 h**	**% of Total in Urine**
M2	0.00386	3.71
M3	0.0200	19.2
M5	0.00876	8.42
M6	0.00981	9.43
M7	0.0144	13.9
M8	0.00736	7.08
M9	0.00631	6.07
M10	0.00666	6.40
VEL	0.00701	6.74
Total in Urine	0.104	100

10.5 AD-281-2024：イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Dogs after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2024

	Metabolite Profile in Urine from Bile Duct-Cannulated Dogs	
	% Administered Dose by Collection Interval	
Compound	**0-24 h**	**% of Total in Urine**
M3	0.0284	21.4
M5	0.00687	5.17
M6	0.0146	11.0
M7	0.0275	20.7
M10	0.00773	5.81
VEL	0.00344	2.59
Total in Urine	0.133	100

10.5 AD-281-2024：イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Dogs after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2024

	Metabolite Profile in Bile from Bile Duct-Cannulated Dogs				
	% Administered Dose by Collection Interval				
Compound	**0-4 h**	**4-8 h**	**8-24 h**	**Sum (0-24 h)**	**% of Total in Bile**
M12	0.245	0.0408	0.0254	0.311	1.76
M14	0.149	0.199	0.0567	0.405	2.29
M18	0.393	0.347	0.158	0.899	5.08
M19	1.95	2.46	1.37	5.78	32.7
VEL	3.67	4.00	2.15	9.82	55.5
Total in Bile	6.61	7.16	3.91	17.7	100

10.5 AD-281-2024：イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Dogs after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2024

	Metabolite Profile in Feces from Bile Duct-Intact Dogs				
	% Administered Dose by Collection Interval				
Compound	**0-24 h**	**24-48 h**	**48-72 h**	**Sum (0-72 h)**	**% of Total in Feces**
M8	0.461	0.102	ND	0.563	0.60
M14	0.569	0.320	ND	0.889	0.95
M18	1.78	0.890	ND	2.67	2.86
M19	5.41	3.54	0.356	9.31	9.97
VEL	62.1	13.9	0.754	76.8	82.2
Total in Feces	72.0	20.1	1.32	93.4	100

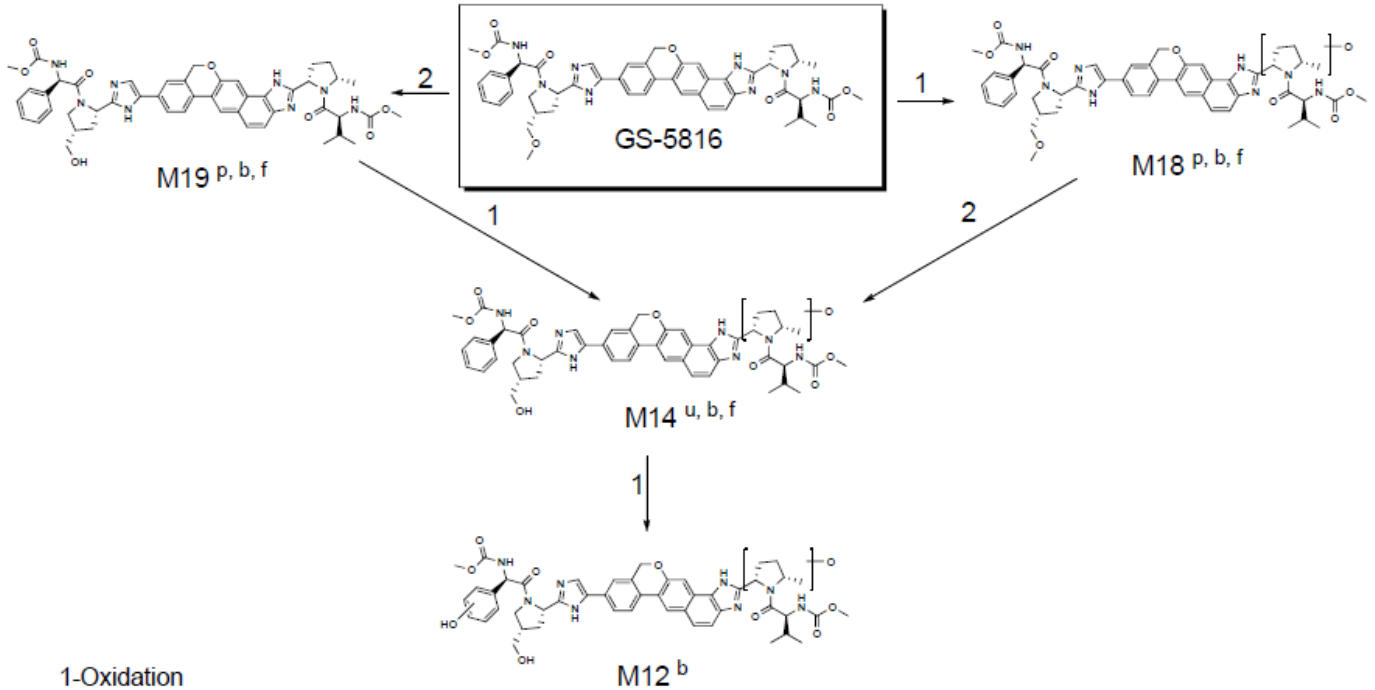
10.5 AD-281-2024：イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを投与後の代謝プロファイリング（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Profiling and Identification of Metabolites in Selected Plasma, Urine, Bile, and Feces Samples from Dogs after Oral Administration of ^{14}C-GS-5816	Metabolism	[^{14}C]VEL	AD-281-2024

	Metabolite Profile in Feces from Bile Duct-Cannulated Dogs				
	% Administered Dose by Collection Interval				
Compound	**0-24 h**	**24-48 h**	**48-72 h**	**Sum (0-72 h)**	**% of Total in Feces**
M8	0.504	0.229	0.131	0.864	1.22
M18	0.464	0.229	0.240	0.933	1.32
M19	ND	0.0865	ND	0.0865	0.12
VEL	30.6	15.0	9.51	55.1	78.0
Total in Feces	42.2	17.7	10.7	70.6	100

AUC_{0-8} = area under the concentration-time curve from 0.5 hours (first time point referred to as zero point) to the last measurable time point (8 hours postdose); eq = equivalents [^{14}C]-GS-5816; M12 = desmethyl-dihydroxy-VEL-1; M14 = desmethyl-hydroxy-VEL-1; M18 = hydroxy-VEL-1; M19 = desmethyl-VEL; no other metabolites were identifiable due to low concentration; ND = peak not detected or below the established limit of quantitation ; VEL = velpatasvir (GS-5816)

10.6　　イヌでのベルパタスビルの推定代謝経路



11　薬物動態試験：推定代謝経路（ベルパタスビル）

2.6.5.10.2 項、2.6.5.10.4 項及び 2.6.5.10.6 項に記載。

12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

12.1 ソホスブビル

12.1.1 AD-334-2010：CYP 阻害剤及び HIV 阻害薬のソホスブビル代謝への影響

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Effect of Either Cytochrome P450 or HCV Inhibitors on Triphosphate Formation in Primary Human Hepatocytes Following Incubation with GS-7977	Metabolism	SOF	AD-334-2010

Method:	SOF was at 10 µmol/L either alone or in combination (following a 30-minute preincubation) with various cytochrome P450 inhibitors or HCV inhibitors for 2 hours. Inhibitors tested were incubated at either 5 µmol/L (ritonavir) or 10 µmol/L (Ledipasvir, GS-9451, GS-9190, VEL, GS-9669, and ketoconazole). The intracellular metabolites were extracted and analyzed by LC-MS/MS.

Inhibitor	**Intracellular Concentration of GS-461203 (pmol/million cells)[a]**
No Inhibitor	69.8
Ledipasvir (NS5A)	49.7
GS-9451 (NS3)	57.3
GS-9190 (NS5B NNI)	53.4
VEL (NS5A)	49.5
GS-9669 (NS5B NNI)	53.8
Ritonavir	58.6
Ketoconazole	60.2

CYP = cytochrome P450; HCV = hepatitis C virus; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; NNI = nonnucleoside inhibitor; NS3 = nonstructural protein 3; NS5A = nonstructural protein 5A; NS5B = nonstructural protein 5B; SOF = sofosbuvir
a Values represent mean of duplicate experiments

12.1.2 AD-334-2026：ソホスブビルによる CYP 阻害

Report Title	Study Type	Test Article	Report Number
In Vitro Assessment of Human Hepatic Microsomal Cytochrome P450 Mechanism-Based Inhibition Potential of GS-7977	CYP inhibition	SOF	AD-334-2026

Method:	Sofosbuvir (up to 50 µmol/L) was incubated with pooled human liver microsomal fraction and NADPH in the presence of individual probe substrates for each CYP enzyme. All assays were designed so that conditions were linear with respect to time and protein concentration. Substrates were present at concentrations equal to or lower than their respective K_m values.

CYP Enzyme	Probe Activity	Calculated % Change	
		Control Inhibitor[a]	SOF
CYP1A2	Ethoxyresorufin O-deethylase	67.1 ± 6.6 53.1 ± 1.5	-8.8 ± 3.4
CYP2B6	Bupropion 4-hydroxylase	76.5 ± 0.4	-0.9 ± 7.0
CYP2C8	Paclitaxel 6α-hydroxylase	48.4 ± 5.6	4.9 ± 0.7
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylase	79.2 ± 0.4	4.0 ± 1.5
CYP2C19	S-Mephenytoin 4'-hydroxylase	61.3 ± 1.0	2.2 ± 1.9
CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylase	81.7 ± 0.6	3.4 ± 2.1
CYP3A	Midazolam 1'-hydroxylase	61.8 ± 0.8 82.2 ± 0.2	± 1.8

CYP = cytochrome P450; NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; SOF = sofosbuvir
a CYP1A2, furafylline and resveratrol; CYP2B6, ticlopidine; CYP2C8, gemfibrozil glucuronide; CYP2C9, tienilic acid; CYP2C19, ticlopidine; CYP2D6, paroxetine; CYP3A, mibefradril and mifepristone

12.2 ベルパタスビル

12.2.1 AD-281-2008：ベルパタスビルによる CYP 阻害

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Assessment of Human Liver Cytochrome P450 Inhibition Potential of GS-5816	CYP Inhinition	VEL	AD-281-2008

Method:	Test compound (up to 25 µmol/L) was incubated with pooled human hepatic microsomal fraction and NADPH in the presence of individual probe substrates for each CYP enzyme. All assays were designed so that conditions were linear with respect to time and protein concentration. Substrates were present at concentrations equal to or lower than their respective K_m values.

		Calculated IC_{50} Value (µmol/L)	
Enzyme	**Activity**	**Control Inhibitor[a]**	**VEL**
CYP1A2	Ethoxyresorufin *O*-deethylase	0.06	> 25
CYP2B6	Bupropion 4-hydroxylase	0.68	> 25
CYP2C8	Paclitaxel 6α-hydroxylase	0.55	> 25
CYP2C9	Tolbutamide 4-hydroxylase	0.60	> 25
CYP2C19	*S*-Mephenytoin 4'-hydroxylase	7.08	> 25
CYP2D6	Dextromethorphan *O*-demethylase	0.04	> 25
CYP3A	Midazolam 1'-hydroxylase	0.04	> 25
CYP3A	Testosterone 6β-hydroxylase	0.09	> 25

CYP = cytochrome P450; K_m = michaelis-menten constant, ie substrate concentration at which the reaction rate is half the maximum velocity; NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Values represent the mean of triplicate determinations
a Control Inhibitors: CYP1A2, α-Naphthoflavone (0−3 µmol/L); CYP2C8 Montelukast (0−3 µmol/L); CYP2C9, Sulfaphenazole (0−10 µmol/L); CYP2C19, Tranylcypromine (0−50 µmol/L); CYP2D6, Quinidine (0−3 µmol/L); CYP3A, Ketoconazole (0−3 µmol/L); CYP2B6 ticlopidine (0-10 µmol/L).

12.2.2 AD-281-2016：ベルパタスビルによる UGT1A1 阻害

Report Title	Study Type	Test Article	Report Number
In Vitro Assessment of Human UGT1A1 Inhibition Potential of GS-5816	UGT inhibition	VEL	AD-281-2016

Method:	Test compound (0.4-100 µmol/L) was incubated with insect cell microsomal fraction containing baculovirus-expressed human UGT1A1 (Supersomes^{TM}) (final protein concentration 0.25 mg/mL), alamethicin (25 µg/mL) and UDP-glucuronic acid (5 mmol/L), and the substrate, estradiol (10 µmol/L). The UGT1A1-selective metabolite, estradiol 3-glucuronide, was monitored by LC-MS/MS. A decrease in the formation of the metabolite compared to the vehicle control was used to calculate an IC_{50} value. The concentration of estradiol substrate is below its measured K_m value.

		Calculated IC_{50} (µmol/L)	
Enzyme	**Activity**	**Control Inhibitor[a]**	**VEL**
UGT1A1	Estradiol 3-Glucuronidation	1.99	1.56

LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; UDP = uridine 5'-diphosphate; UGT = UDP glucuronosyl transferase; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Control Inhibitor: silybin (0-100 µmol/L)

12.2.3 AD-281-2009：ベルパタスビルの *in vitro* での AhR 及び PXR への影響

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Assessment of Induction Potential of GS-5816 in Humans	Induction	VEL	AD-281-2009

Method:	For AhR activation assay, CYP1A2-DRE cells were transformed with an expression vector for human AhR and the Dioxin Response Element (DRE) of the human CYP1A2 gene linked to a luciferase reporter. For PXR activation assay, DPX2 cells are stably transformed with an expression vector for human PXR and a reporter gene vector containing the enhancer regions of CYP3A4 linked to luciferase. Following 24 h of exposure to VEL or controls, the luciferase substrate was added and the luminescence was read in a luminometer. The average luminescent units for three replicates were divided by the average for the DMSO solvent control to determine the fold-induction.

Concentration (µmol/L)	**Fold AhR Activation Over 0.1% DMSO Control**	
	VEL	**β-Naphthoflavone (Positive control)**
0.1	—	1.61
0.15	0.97	—
0.5	0.81	2.80
1	—	4.15
1.5	0.76	—
5	0.73	21.5
10	—	41.6
15	0.61	—
20	—	70.0
50	0.77	—

12.2.3 AD-281-2009：ベルパタスビルの in *vitro* での *AhR* 及び *PXR* への影響（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Assessment of Induction of GS-5816 in Humans	Induction	VEL	AD-281-2009

VEL Concentration (µmol/L)	**Fold AhR Activation Over 0.1% DMSO Control**	
	VEL	**Rifampicin (Positive Control)**
0.1	—	1.68
0.15	1.30	—
0.5	1.67	4.45
1	—	6.23
1.5	2.48	—
5	2.53	11.6
10	—	12.7
15	2.91	—
20	—	12.6
50	2.70	—

AhR = aryl hydrocarbon receptor; DMSO = dimethyl sulfoxide; PXR = pregnane X receptor; VEL = velpatasvir (GS-5816)

12.2.4 AD-281-2025：ヒト培養肝細胞でのベルパタスビルによる誘導作用

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Evaluation of Induction Potential of GS-5816 in Cultured Human Hepatocytes	Induction	VEL	AD-281-2025

Method:	Human hepatocytes from 3 separate donor livers were incubated for 3 days with VEL, positive control inducers (omeprazole, phenobarbital, rifampin and β-naphthoflavone) and solvent vehicle controls, in sets of triplicate monolayers. The medium was replaced daily with fresh medium containing VEL or the controls. After treatment, the cells were harvested to isolate microsomes for the analysis of phenacetin-*O*-dealkylation (marker for CYP1A2), bupropion hydroxylation (marker for CYP2B6) and testosterone 6β-hydroxylation (marker for CYP3A4) by LC-MS/MS. In addition, mRNA levels were analyzed by qRT-PCR to assess the effect of VEL on CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, UGT1A1 and P-gp mRNA expression.

	Fold Increase in CYP Activity[a]		
Treatment (concentration)	**Phenacetin *O*-dealkylation (CYP1A2)**	**Bupropion hydroxylation (CYP2B6)**	**Testosterone 6β-hydroxylation (CYP3A4)**
VEL (1 μmol/L)	1.10 ± 0.20	1.73 ± 0.06	1.58 ± 1.15
VEL (3 μmol/L)	0.92 ± 0.06	1.73 ± 0.25	1.69 ± 1.39
VEL (10 μmol/L)	0.83 ± 0.26	1.67 ± 0.49	1.67 ± 1.36
Omeprazole (50 μmol/L)	35.3 ± 7.0	NA	NA
Phenobarbital (1000 μmol/L)	NA	8.53 ± 1.16	NA
Rifampin (10 μmol/L)	NA	NA	25.3 ± 9.6

12.2.4　AD-281-2025：ヒト培養肝細胞でのベルパタスビルによる誘導作用（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Evaluation of Induction Potential of GS-5816 in Cultured Human Hepatocytes	Induction	VEL	AD-281-2025

Treatment (concentration)	**mRNA Fold Increase[a]**					
	CYP1A2	**CYP2B6**	**CYP3A4**	**CYP2C9**	**UGT1A1**	**P-gp**
VEL (1 µmol/L)	0.86 ± 0.22	1.90 ± 0.61	7.70 ± 5.76	1.57 ± 0.55	1.57 ± 0.21	1.37 ± 0.12
VEL (3 µmol/L)	0.76 ± 0.22	1.43 ± 0.32	13.5 ± 14.3	1.37 ± 0.25	1.53 ± 0.15	1.47 ± 0.25
VEL (10 µmol/L)	0.77 ± 0.39	1.58 ± 0.68	11.9 ± 11.5	1.46 ± 0.52	1.50 ± 0.30	1.43 ± 0.32
Omeprazole (50 µmol/L)	50.0 ± 50.3	NA	NA	NA	NA	NA
Phenobarbital (1000 µmol/L)	NA	17.0 ± 5.0	NA	NA	NA	2.23 ± 0.15
Rifampin (10 µmol/L)	NA	NA	114 ± 70	3.17 ± 0.32	NA	NA
β-naphthoflavone (20 µmol/L)	NA	NA	NA	NA	2.60 ± 1.15	NA

CYP = cytochrome P450; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; NA = not applicable; P-gp = P-glycoprotein; UDP = uridine 5'-diphosphate; UGT = UDP glucuronosyl transferase; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Data are the mean ± standard deviation from 3 donors
a Fold increase: the fold change of treated samples compared to vehicle control

13　薬物動態試験：排泄（ベルパタスビル）

13.1　AD-281-2021：マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Mice	Excretion	[^{14}C]VEL	AD-281-2021

Species	CD-1 Mouse
Gender/No. of Animals	Male/4
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	45% PG, 15% kolliphor HS 15, and 40% reverse osmosis water (pH 2.0, adjusted with HCl)
Method of Administration	Oral gavage
Dose	20 mg/kg (200 µCi/kg)
Specific Activity	56.0 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	9.75 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid scintillation counting

13.1 AD-281-2021：マウスに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Mice	Excretion	[^{14}C]VEL	AD-281-2021

Collection Period (h)	**Cumulative Recovery of Total Radioactivity (% Dose) by Excretion Route[a]**		
	Urine	**Feces**	**Total**
0 - 12 h	0.0986 %	—	0.0986 %
0 - 24 h	0.192 %	92.5 %	92.7 %
0 - 48 h	0.220 %	95.4 %	95.6 %
0 - 72 h	0.228 %	95.6 %	95.8 %
0 - 96 h	0.234 %	95.7 %	95.9 %
0 - 120 h	0.241 %	95.8 %	96.0 %
0 - 144 h	0.257 %	95.8 %	96.1 %
0 - 168 h	0.262 %	95.9 %	96.2 %

nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; PG = propylene glycol; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Recovery of radioactivity from cage washes, cage rinse, cage wipe, and residual carcass totaled < 0.4 % of dose. Data presented as the mean of 2 cages, each housing 2 mice.

13.2 AD-281-2018：胆管カニューレ処置 Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Excretion	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

Species	Sprague-Dawley Rat
Gender/No. of Animals	Male/3 (Bile duct-intact)
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	45%PG, 15% Solutol HS-15, and 40% reverse osmosis water (v:v:v), pH adjusted to 2.0 with dilute HCl
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	30 mg/kg (100 µCi/kg)
Specific Activity	56.7 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	3.06 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid scintillation counting

	Cumulative Recovery of Total Radioactivity (% Dose) by Excretion Route[a]		
Collection Period (h)	**Urine**	**Feces**	**Total**
0–8	0.15 ± 0.02%	—	0.15 ± 0.02%
0–24	0.20 ± 0.02%	91.2 ± 3.1%	91.4 ± 3.0%
0–48	0.21 ± 0.02%	96.8 ± 0.9%	97.0 ± 0.9%
0–72	0.21 ± 0.02%	96.9 ± 1.0%	97.1 ± 1.0%
0–96	0.21 ± 0.02%	96.9 ± 1.0%	97.1 ± 1.0%
0–120	0.21 ± 0.02%	96.9 ± 1.0%	97.1 ± 1.0%
0–144	0.21 ± 0.02%	96.9 ± 1.0%	97.1 ± 1.0%
0–168	0.21 ± 0.02%	96.9 ± 1.0%	97.1 ± 1.0%

13.2　AD-281-2018：胆管カニューレ処置 Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, Distribution, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Rats	Excretion	[^{14}C]VEL	AD-281-2018

Species	Sprague-Dawley Rat
Gender/No. of Animals	Male/3 (Bile duct-cannulated)
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	45%PG, 15% Solutol HS-15, and 40% reverse osmosis water (v:v:v), pH adjusted to 2.0 with dilute HCl
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	30 mg/kg (100 µCi/kg)
Specific Activity	56.7 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	3.06 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid scintillation counting

13.2　AD-281-2018：胆管カニューレ処置 Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄（続き）

Collection Period (h)	Cumulative Recovery of Total Radioactivity (% Dose) by Excretion Route[b]			
	Bile	Urine	Feces	Total
0–4	1.11 ± 0.33%	0.06 ± 0.05%	—	1.17 ± 0.38%
0–8	4.38 ± 1.37%	0.13 ± 0.06%	—	4.51 ± 1.43%
0–24	12.0 ± 2.3%	0.23 ± 0.08%	79.6 ± 2.2%	91.8 ± 4.5%
0–48	13.3 ± 1.9%	0.24 ± 0.07%	83.1 ± 1.5%	96.6 ± 3.5%
0–72	13.5 ± 1.8%	0.25 ± 0.08%	83.1 ± 1.5%	96.8 ± 3.5%
0–96	13.6 ± 1.8%	0.25 ± 0.08%	83.1 ± 1.5%	96.9 ± 3.4%
0–120	13.6 ± 1.8%	0.25 ± 0.08%	83.1 ± 1.5%	96.9 ± 3.4%
0–144	13.6 ± 1.8%	0.25 ± 0.08%	83.1 ± 1.5%	96.9 ± 3.4%
0–168	13.7 ± 1.8%	0.25 ± 0.08%	83.1 ± 1.5%	97.0 ± 3.4%

nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; PG = propylene glycol; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Recovery of radioactivity from cage washes and cage rinse totaled < 0.005 % of total dose (Values are mean ± standard deviation).

b Recovery of radioactivity from cage rinse, cage washes, cage wipe, bile cannula, and jacket rinse < 0.06 % of total dose

13.3 AD-281-2023：胆管カニューレ処置イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Intact and Bile Duct-Cannulated Dogs	Excretion	[^{14}C]VEL	AD-281-2023

Species	Beagle Dogs
Gender/No. of Animals	Male/3 (Bile duct-intact)
Feeding Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	45% PG, 15% Solutol HS-15 and 40% water, pH 2.0
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	10 mg/kg (10 µCi/kg)
Specific Activity	56.0 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	1.03 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid scintillation counting

	Cumulative Recovery of Total Radioactivity (% Dose) by Excretion Route[a]		
Collection Period (h)	**Urine**	**Feces**	**Total**
0–8	0.039 ± 0.034 %	—	0.039 ± 0.034 %
0–24	0.104 ± 0.020 %	72.0 ± 13.0 %	72.1 ± 13.0 %
0–48	0.144 ± 0.041 %	92.0 ± 5.1 %	92.1 ± 5.1 %
0–72	0.164 ± 0.048 %	93.4 ± 6.0 %	93.6 ± 6.0 %
0–96	0.181 ± 0.061 %	93.5 ± 6.1 %	93.7 ± 6.2 %
0–120	0.193 ± 0.074 %	93.6 ± 6.1 %	93.8 ± 6.1 %
0–144	0.198 ± 0.082 %	93.6 ± 6.1 %	93.8 ± 6.2 %
0–168	0.201 ± 0.088 %	93.6 ± 6.0 %	93.8 ± 6.1 %

13.3　AD-281-2023：胆管カニューレ処置イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Intact and Bile Duct-Cannulated Dogs	Excretion	[^{14}C]VEL	AD-281-2023

Species	Beagle Dogs
Gender/No. of Animals	Male/3 (Bile duct-cannulated)
Feeding Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	45% PG, 15% Solutol HS-15 and 40% water, pH 2.0
Method of Administration	Oral Gavage
Dose	10 mg/kg (10 µCi/kg)
Specific Activity	56.0 mCi/mmol
Specific Activity of Formulation	1.03 µCi/mg
Analyte/Assay	Carbon-14/Liquid scintillation counting

13.3 AD-281-2023：胆管カニューレ処置イヌに[^{14}C]ベルパタスビルを経口投与後の排泄（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics, Absorption, and Excretion of ^{14}C-GS-5816 Following Oral Administration to Intact and Bile Duct-Cannulated Dogs	Excretion	[^{14}C]VEL	AD-281-2023

	Cumulative Recovery of Total Radioactivity (% Dose) by Excretion Route[b]			
Collection Period (h)	**Bile**	**Urine**	**Feces**	**Total**
0–1	0.37 ± 0.11 %	—	—	0.37 ± 0.11 %
0–2	2.44 ± 0.61 %	—	—	2.44 ± 0.61 %
0–4	6.61 ± 1.46 %	0.0368 ± 0.0071 %	—	6.65 ± 1.47%
0–6	11.9 ± 1.6 %	—	—	11.9 ± 1.6 %
0–8	13.8 ± 1.9 %	0.0515 ± 0.0292 %	—	13.9 ± 1.9 %
0–12	15.8 ± 2.2 %	—	—	15.8 ± 2.2 %
0–24	17.7 ± 2.5 %	0.132 ± 0.015 %	42.2 ± 36.4 %	60.0 ± 38.9 %
0–48	18.5 ± 3.0 %	0.190 ± 0.036 %	59.9 ± 16.6 %	78.6 ± 19.6 %
0–72	18.7 ± 3.2 %	0.212 ± 0.055 %	70.6 ± 0.9 %	89.5 ± 4.1 %
0–96	18.7 ± 3.2 %	0.231 ± 0.052 %	71.0 ± 0.9 %	89.9 ± 4.1 %
0–120	18.7 ± 3.2 %	0.245 ± 0.054 %	71.2 ± 1.0 %	90.1 ± 4.3 %
0–144	18.7 ± 3.2 %	0.245 ± 0.054 %	71.2 ± 1.1 %	90.1 ± 4.3 %
0–168	18.7 ± 3.2 %	0.245 ± 0.054 %	71.2 ± 1.1 %	90.1 ± 4.3 %

fasted = animals were fasted overnight prior to dose administration and up to 4 hours after dosing; PG = propylene glycol; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Values are mean ± standard deviation from 3 animals
a Recovery of radioactivity from cage debris, cage wash, cage rinse, and cage wipe totaled < 1.2 % of total dose.
b Recovery of radioactivity from cage debris, cage wash, cage wipe, cage rinse, bile cannula, and jacket rinse totaled < 0.90 % of total dose.

13.4 AD-281-2005：胆管カニューレ処置ラットにベルパタスビルを静脈内投与後の排泄

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Pharmacokinetics of GS-5816 in Bile Duct-Cannulated Rats	Excretion	VEL	AD-281-2005

Species	Sprague-Dawley rats
Gender/ No. of Animals	Male/3
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle / Formulation	5% ethanol, 35% PEG 400, and 60% water, pH 2.0
Method of Administration	IV infusion
Dose (mg/kg)	2.0
Analyte	VEL
Assay	LC-MS/MS

	Excretion Route		
Collection Period (h)	**Bile**	**Urine[a]**	**Total**
0–1 h	2.3 ± 0.8%	—	2.3 ± 0.8%
0–2 h	6.7 ± 3.9%	—	6.7 ± 3.9%
0–4 h	10.2 ± 6.2%	—	10.2 ± 6.2%
0–6 h	12.6 ± 8.6%	—	12.6 ± 8.6%
0–8 h	13.7 ± 9.5%	—	13.7 ± 9.5%
0–12 h	15.2 ± 11.4%	0.03 ± 0.03%	15.2 ± 11.4%
0–24 h	15.8 ± 12.3%	BLQ	15.8 ± 12.3%
0–48 h	15.9 ± 12.4%	BLQ	15.9 ± 12.4%

BLQ = below the limit of quantitation in urine. (< 2 nmol/L); nonfasted = animals had access to certified food *ad libitum*; IV = intravenous; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; PEG = polyethylene glycol; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Three time points (0–12, 12–24, and 24–48h) were collected for the urine samples. Values are mean ± standard deviation from 3 animals.

14　薬物動態試験：排泄：胆汁中（ベルパタスビル）

排泄の項に記載。

15 薬物動態試験：薬物相互作用

15.1 ソホスブビル

15.1.1 AD-334-2002：他剤によるソホスブビル膜透過性への影響を評価する *in vitro* 試験

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Effect of HCV Inhibitors from Different Classes Ledipasvir, GS-9451, GS-9190, GS-5816 and GS-9669 on the Bidirectional Permeability of GS-7977 Through Monolayers of Caco-2 Cells	Drug Interaction (Caco 2 permeability)	SOF	AD-334-2002

Method:	The bidirectional permeability of 10 µmol/L SOF through monolayers of Caco-2 cells in 12-well trans well plates was determined in the presence or absence of CsA and HCV inhibitors from different classes.

Inhibitor (Concentration)	P_{app} (x 10^{-6} cm/s)		Efflux Ratio
	Forward (A→B)	Reverse (B→A)	
None	0.25	10.9	43.6
CsA (10 µmol/L)	0.46	0.64	1.4
VEL (1 µmol/L)	0.66	7.39	11.2
Ledipasvir (1 µmol/L)	0.35	8.1	22.9
GS-9190 (10 µmol/L)	0.69	11.1	16.1
GS-9451 (30 µmol/L)	1.09	1.17	1.1
GS-9669 (100 µmol/L)	0.30	6.93	23.4

A = apical; B = basolateral; CsA = cyclosporine A; P_{app} = apparent permeability; SOF = sofosbuvir; VEL = velpatasvir (GS-5816)
Experiments were done in duplicate

15.1.2 AD-334-2023：高濃度のソホスブビルによる P-gp への阻害を評価する *in vitro* 試験

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Inhibition of Human P-gp by High Concentrations of Sofosbuvir	Drug Transport	SOF	AD-334-2023

Method:	For P-gp assay, SOF (tested at 6 concentrations ranging from 1.23 to 300 µmol/L) or a positive control (verapamil) was incubated for 1 h with MDCKII cells in a buffer containing 10 µmol/L Calcein AM in 96-well black cell culture plates with clear bottoms at a density of 5 x 10^4 cells/well. Following incubation and washing, the cells were lysed and each well was analyzed for calcein fluorescence at an excitation of 494 nm and an emission of 517 nm.

	Efflux Transporter IC_{50} (µmol/L)
Test Article	P-gp
Sofosbuvir	> 300
Verapamil	6.2 ± 2.3

MDCK = Madin-Darby canine kidney; P-gp = P-glycoprotein; SOF = sofosbuvir
Experiments were done in duplicate

15.1.3 AD-334-2024：高濃度の GS-331007 による P-gp、OCT1、OCT2、MATE1、OAT3、BSEP 及び MRP2 に対する阻害を評価する *in vitro* 試験

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Inhibition Studies of P-gp, OCT1, OCT2, MATE1, OAT3, BSEP, and MRP2 Transporters by High Concentrations of GS-331007	Drug Transport	GS-331007	AD-334-2024

Method:	For P-gp assay, GS-331007 or a positive control (verapamil) was incubated for 1 h with MDCKII cells in a buffer containing 10 µmol/L Calcein AM in 96-well black cell culture plates with clear bottoms at a density of 5 x 10^4 cells/well. Following incubation and washing, the cells were lysed and each well was analyzed for calcein fluorescence at an excitation of 494 nm and an emission of 517 nm. To measure OCT1, OCT2 and MATE1 transporter inhibition, increasing concentrations of GS-331007 was incubated with Chinese hamster ovary (CHO) cells in the presence of probe substrates triethylamine for OCT1, OCT2, and MATE1. For OAT3 inhibition, increasing concentrations of GS-331007 was incubated with FlpIn293 cells in the presence of a probe substrate (estrone-3-sulfate). Transporter specific accumulation of the probe substrate in the cells was measured. For BSEP and MRP2 assay, GS-331007 was incubated with membrane vesicle preparations (total protein: 50 µg/well) and probe substrates, taurocholate (2 µmol/L) for BSEP or E217βG (50 µmol/L) for MRP2, in the absence or presence of ATP. The amounts of probe substrates inside the filtered vesicles was determined by liquid scintillation after washing

15.1.3　AD-334-2024：高濃度の GS-331007 による P-gp、OCT1、OCT2、MATE1、OAT3、BSEP 及び MRP2 に対する阻害を評価する in *vitro* 試験（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Inhibition Studies of P-gp, OCT1, OCT2, MATE1, OAT3, BSEP, and MRP2 Transporters by High Concentrations of GS-331007	Drug Transport	GS-331007	AD-334-2024

	Vesicular Transporter Inhibition	
Transporter	Maximum Inhibition (% of Control)	IC_{50} (µmol/L)
BSEP	No inhibition	NA
MRP2	No inhibition	NA
	Uptake Transporter Inhibition	
Transporter	Maximum Inhibition (% of Control)	IC_{50} (µmol/L)
OCT1	No inhibition	NA
OCT2	17% at 300 µmol/L	NA
OAT3	34% at 300 µmol/L	NA
MATE1	No inhibition	NA
	Efflux transporter inhibition	
Transporter	Maximum Inhibition (% of Control)	IC_{50} (µmol/L)
P-gp	No inhibition	NA

ATP = adenosine 5'-triphosphate; BSEP = bile salt export pump; GS-331007 = nucleoside analog; MATE = multidrug and toxin extrusion protein; MDCK = Madin-Darby canine kidney; MRP = multidrug resistance protein; NA= not available; OAT = organic anion transporter; OCT = organic cation transporter; P-gp = P-glycoprotein

15.1.4 AD-334-2025：ヒト肝細胞を用いたソホスブビル又は GS-331007 のイリノテカン代謝への影響

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Metabolism of Irinotecan Following Co-Incubation with Either Sofosbuvir or GS-331007 in Primary Human Hepatocytes	Metabolism	SOF and GS-331007	AD-334-2025

Method:	Primary human hepatocytes from 2 different donors were incubated with either 10 µmol/L irinotecan alone or in combination with either 100 µmol/L sofosbuvir or 300 µmol/L GS-331007 for 24 hours to access the effect of sofosbuvir or GS-331007 on the metabolism of irinotecan in primary human hepatocytes. The intracellular metabolites were extracted and analyzed by LC-MS/MS.

Mean intracellular SN-38 concentrations in human hepatocytes during a 24 h incubation with 10 µmol/L irinotecan alone or in presence of 100 µmol/L SOF or 300 µmol/L GS-331007

Intracellular SN-38 Concentration (pmol/million)[a, b]			
Time (h)	**Irinotecan**	**Irinotecan +Sofosbuvir**	**Irinotecan + GS-331007**
1	7.15	5.43	7.31
2	5.03	4.81	9.13
4	10.4	2.06	14.8
6	11.7	0.936	14.4
10	12.4	1.24	11.4
24	6.40	2.07	11.7

Mean intracellular GS-461203 concentrations in human hepatocytes during a 24 h incubation with 100 µmol/L SOF alone or in presence of 10 µmol/L irinotecan

Intracellular GS-461203 Concentration (pmol/million)[a, b]		
Time (h)	**Sofosbuvir**	**Irinotecan +Sofosbuvir**
1	75.4	59.7
2	186	125
4	268	301
6	320	296
10	705	546
24	711	818

GS-331007 = nucleoside analog; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; SOF = sofosbuvir
a Intracellular concentration in µmol/L can be estimated assuming an intracellular volume of 1 µL/million cells
b Values represent the mean of duplicate wells

15.2 ベルパタスビル

15.2.1 AD-281-2010：ベルパタスビルによる *in vitro* での OATP1B1、OATP1B3、P-gp 及び BCRP 阻害

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Assessment of GS-5816 Inhibition of Human OATP1B1, OATP1B3, P-gp, and BCRP	Drug Transport	VEL	AD-281-2010

Method:	Velpatasvir or a positive control (rifampicin) was incubated for 1 h with OATP1B1- or OATP1B3-overexpressing Chinese hamster ovary (CHO) cells in a buffer containing 2 µmol/L Fluo 3 in BioCoat Poly-D-Lysine coated 96-well black cell culture plates with clear bottoms at a density of 1 x 10^5 cells/well. Following incubation and washing, the cells were lysed and each well was analyzed for Fluo 3 fluorescence at an excitation of 485 nm and emission of 530 nm. For the P-gp assay, VEL or a positive control (verapamil) was incubated for 1 h with MDCKII cells in a buffer containing 10 µmol/L Calcein AM in 96-well black cell culture plates with clear bottoms at a density of 5 x 10^4 cells/well. Following incubation and washing, the cells were lysed and each well was analyzed for calcein fluorescence at an excitation of 494 nm and an emission of 517 nm. For BCRP assay, VEL or a positive control (Fumitremorgin C (FTC)) was incubated for 18 h with MDCKII-ABCG2 cells in a buffer containing 1 µmol/L pheophorbide a (PhA) in 96-well black cell culture plates with clear bottoms at a density of 2 x 10^4 cells/well. Following incubation and washing, the cells were lysed and each well was analyzed for PhA fluorescence at an excitation of 415 nm and an emission of 675 nm.

Compound	**IC_{50} (µmol/L)**	
	OATP1B1	**OATP1B3**
VEL	1.5 ± 0.5	0.26 ± 0.03
Rifampicin	3.7 ± 0.3	3.0 ± 1.0

15.2.1　AD-281-2010：ベルパタスビルによる *in vitro* での OATP1B1、OATP1B3、P-gp 及び BCRP 阻害（続き）

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Assessment of GS-5816 Inhibition of Human OATP1B1, OATP1B3, P-gp, and BCRP	Drug Transport	VEL	AD-281-2010

Compound	**Efflux Transporters IC_{50} (µmol/L)**	
	P-gp	**BCRP**
VEL	20.6 ± 5.7	0.30 ± 0.04
Verapamil	5.1 ± 2.8	NA
Fumitremorgin C (FTC)	NA	0.23 ± 0.08

BCRP = breast cancer resistance protein; CHO = Chinese hamster ovary; MDCK = Madin-Darby canine kidney; OATP = organic anion-transporting polypeptide; P-gp = P-glycoprotein; VEL = velpatasvir (GS-5816)

15.2.2 AD-281-2040：ベルパタスビルによる *in vitro* での OATP1A2 及び OATP2B1 阻害

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Inhibition Studies of GS-5816 with Human OATP1A2 and OATP2B1 Transporters	Drug Transport	VEL	AD-281-2040

Method:	OATP1A2–overexpressing human embryonic kidney 293 (HEK293) cells or OATP2B1-overexpressing Madin-Darby canine kidney (MDCKII) cells were incubated with [^{3}H]estrone-3-sulfate (E3S) (1 µmol/L for OATP1A2 and 0.2 µmol/L for OATP2B1) in 96-well cell culture plates in the absence or presence of VEL (at 7 concentrations from 0.014 to 10 µmol/L). [^{3}H]E3S-derived radioactivity in cell lysates was determined with liquid scintillation counter. Sulfobromophthalein at 500 µmol/L served as a positive control for OATP1A2 inhibition. Fluvastatin at 10 µmol/L served as a positive control for OATP2B1 inhibition.

Compound	**IC_{50} (µmol/L)**	
	OATP1A2	**OATP2B1**
VEL	>10	>10
Compound	**Observed Effect (% Inhibition)**	
	OATP1A2	**OATP2B1**
VEL	No inhibition*	30*
Sulfobromophthalein	81	—
Fluvastatin	—	90

E3S = estrone-3-sulfate; MDCK = Madin-Darby canine kidney; NA = not applicable; OATP = organic anion-transporting polypeptide; VEL = velpatasvir (GS-5816)
* % inhibition at 10 µmol/L VEL

15.2.3 AD-281-2011：ベルパタスビルが *in vitro* での OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるかどうかの検討

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Assessment of GS-5816 as a Substrate for Human OATP1B1 and OATP1B3	Drug Transport	VEL	AD-281-2011

Method:	The uptake rate of VEL and control compounds was determined in the absence or presence of 40 µmol/L rifampicin in wild type (WT), OATP1B1-, or OATP1B3-overexpressing Chinese Hamster Ovary (CHO) cells.

	Uptake Rate in the Absence of Rifampicin (pmole/minute/1.0x10^6 cells)		
Cell Type	**VEL (0.1 µmol/L)**	**Atorvastatin (0.1 µmol/L)[a]**	**Antipyrine (10 µmol/L)[b]**
CHO-WT	3.1	0.4	16
CHO-OATP1B1	2.5	6.9	16
CHO-OATP1B3	5.4	7.4	17
OATP1B1/WT Ratio	0.8	16	1.0
OATP1B3/WT Ratio	1.7	17	1.1
	Uptake Rate in the Presence of 40 µmol/L Rifampicin (pmole/minute/1.0x10^6 cells)		
Cell Type	**VEL (0.1 µmol/L)**	**Atorvastatin (0.1 µmol/L)[a]**	**Antipyrine (10 µmol/L)[b]**
CHO-WT	4.2	0.6	16
CHO-OATP1B1	2.4	0.8	17
CHO-OATP1B3	3.2	0.5	17

CHO = Chinese hamster ovary; CHO-OATP1B1 = OATP1B1-overexpressing CHO cells; CHO-OATP1B3 = OATP1B3-overexpressing CHO cells; CHO-WT = wild type CHO cells; OATP = organic anion-transporting polypeptide; VEL = velpatasvir (GS-5816)

a Atorvastatin is an OATP substrate and served as a positive control in this study

b Antipyrine served as a control for passive permeability

15.2.4 AD-281-2041：ベルパタスビルが *in vitro* での P-gp 及び BCRP の基質であるかどうかの検討

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Effect of P-glycoprotein and BCRP Expression on GS-5816 Accumulation *In Vitro*	Drug Transport	[^{14}C]VEL	AD-281-2041

Method:	[^{14}C]VEL at 50 nmol/L or prazosin (a positive control) at 10 µmol/L was dosed in the culture media in presence or absence of various inhibitors and incubated with wild type (WT), P-gp- or BCRP-overexpressing Madin-Darby canine kidney (MDCKII) cells at 37°C for 60 minutes. Compound concentration in cell lysate was determined by liquid scintillation counter or by LC-MS/MS.

	Uptake of VEL as % of WT Untreated		
Cell Type	**VEL (0.05 µmol/L)**	**VEL + 100 µmol/L Verapamil**	**VEL + 5 µmol/L CsA**
WT cells	100	87	86
P-gp-overexpressing cells	6.5	77	76

	Uptake of VEL as % of WT Untreated			
Cell Type	**VEL (0.05 µmol/L)**	**VEL + 30 µmol/L Novobiocin**	**VEL + 2 µmol/L Ko143**	**VEL + 5 µmol/L CsA**
WT cells	100	98	100	93
BCRP-overexpressing cells	50	91	89	97

BCRP = breast cancer resistance protein; CsA = cyclosporine A; LC-MS/MS = high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry; MDCK = Madin-Darby canine kidney; P-gp = P-glycoprotein; VEL = velpatasvir (GS-5816); WT = wild type

15.2.5 AD-281-2012：ベルパタスビルによる *in vitro* での MRP2、BSEP 及び NTCP 阻害

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
In Vitro Assessment of GS-5816 Inhibition of Human MRP2, BSEP, and NTCP	Drug Transport	VEL	AD-281-2012

Method:	Velpatasvir was incubated with membrane vesicle preparations (total protein: 50 µg/well) and probe substrates, taurocholate (2 µmol/L) for BSEP or $E_2$17βG (50 µmol/L) for MRP2, in the absence or presence of ATP. The amount of probe substrates inside the filtered vesicles determined by liquid scintillation after washing. To measure NTCP transporter inhibition, increasing concentrations of VEL was incubated with Chinese hamster ovary (CHO) cells in the presence of probe substrates taurocholate (2 µmol/L) for NTCP.

	Transporter Inhibition	
Transporter	**Maximum Inhibition at Highest Concentration Tested, 40 µmol/L (% of Control)**	**IC_{50} (µmol/L)**
MRP2	130 % activation at 1.48 µmol/L	> 40
BSEP	90%	0.64
NTCP	ND	> 40

BSEP = bile salt export pump; CHO = Chinese hamster ovary; $E_2$17βG = estradiol-17-beta-glucuronide; MRP = multidrug resistance protein; ND = not determined; NTCP = solute carrier (SLC) uptake transporter Na+-taurocholate cotransporting polypeptide; VEL = velpatasvir (GS-5816)

15.2.6 AD-281-2026：ベルパタスビルによる *in vitro* での OAT1、OAT3、OCT2 及び MATE1 阻害

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Studies to Determine if GS-5816 is an Inhibitor of OCT1, OCT2, MATE1, OAT1, and OAT3 or Substrate for OCT1	Drug Transport	VEL	AD-281-2026

Method:	To measure OCT2, OAT1 and MATE1 transporter inhibition, increasing concentrations of VEL was incubated with Chinese hamster ovary (CHO) cells in the presence of probe substrates (*p*-aminohippuric acid) for OAT1, tetraethylammonium for OCT2 and MATE1. For OAT3 inhibition, increasing concentrations of VEL was incubated with FlpIn293 cells in the presence of a probe substrate (estrone-3-sulfate). Transporter specific accumulation of the probe substrate in the cells was measured.

	Transporter Inhibition	
Transporter	**Maximum Inhibition at Highest Concentration Tested, 4 µmol/L (% of Control)**	**IC_{50} (µmol/L)**
OCT2	45%	> 4
OAT1	No inhibition	> 4
OAT3	No inhibition (37% stimulation)	> 4
MATE1	19%	> 4

CHO = Chinese hamster ovary; MATE = multidrug and toxin extrusion protein; OAT = organic anion transporter; OCT = organic cation transporter; VEL = velpatasvir (GS-5816)

15.2.7 AD-281-2026：ベルパタスビルが *in vitro* での OCT1 の基質／阻害剤となるかどうかの検討

Report Title	**Study Type**	**Test Article**	**Report Number**
Studies to Determine if GS-5816 is an Inhibitor of OCT1, OCT2, MATE1, OAT1, and OAT3 or Substrate for OCT1	Drug Transport	VEL	AD-281-2026

Method:	Inhibition of the uptake of probe substrate tetraethylammonium (TEA) into OCT1-overexpressing Chinese hamster ovary (CHO) cells was measured at up to 4 µmol/L of VEL. Accumulation of VEL into OCT1-overexpressing CHO cells was investigated at 2 concentrations (1 and 10 µmol/L) and at 2 incubation time points (1 and 10 min) in an OCT1 substrate assay.

	Effect of VEL on the Human OCT1-Mediated Transport of TEA	
Compound	**IC_{50} (µmol/L)**	**Maximum Inhibition at Highest Concentration Tested, 4 µmol/L (% of Control)**
VEL	> 4 µmol/L	22%

	Accumulation of VEL in OCT1 Uptake Transporter Substrate Assay		
Compound	**Concentration (µmol/L)**	**Incubation Time (min)**	**Fold Accumulation**
VEL	1	1	0.61
		10	0.80
	10	1	0.59
		10	0.80

CHO = Chinese hamster ovary; OCT = organic cation transporter; TEA = tetraethylammonium; VEL = velpatasvir (GS-5816)

16　薬物動態試験：その他

該当なし。