2.6.4　薬物動態試験の概要文の目次

略語一覧 3
2.6.4.1　まとめ 6
2.6.4.2　分析法 9
2.6.4.2.1　ベルイシグアト及び代謝物 M-1 の同位体標識 9
2.6.4.2.1.1　[^{14}C]ベルイシグアト及び[^{13}C,^{2}H$_4$]ベルイシグアトの合成 9
2.6.4.2.1.2　[^{3}H]M-1 及び[^{13}C,^{2}H$_3$]M-1 の合成 9
2.6.4.2.2　総放射能の定量 10
2.6.4.2.3　血漿中ベルイシグアト及び M-1 の定量 10
2.6.4.2.4　代謝物プロファイリング 10
2.6.4.3　吸収 11
2.6.4.3.1　単回投与後の薬物動態 11
2.6.4.3.1.1　ラット 11
2.6.4.3.1.2　イヌ 12
2.6.4.3.2　反復投与後の薬物動態 14
2.6.4.4　分布 14
2.6.4.4.1　臓器・組織分布 14
2.6.4.4.1.1　アルビノラット 14
2.6.4.4.1.2　有色ラット 14
2.6.4.4.2　胎盤通過性 15
2.6.4.4.2.1　ラット 15
2.6.4.4.2.2　ウサギ 15
2.6.4.4.3　*In vitro* 血漿タンパク結合 16
2.6.4.4.4　*In Vitro* 血液／血漿分配 17
2.6.4.5　代謝 18
2.6.4.5.1　*In Vivo* 代謝 19
2.6.4.5.1.1　マウス 19
2.6.4.5.1.2　ラット 19
2.6.4.5.1.3　イヌ 20
2.6.4.5.1.4　ヒト 21
2.6.4.5.2　*In Vitro* 代謝 22
2.6.4.5.2.1　種間比較 22
2.6.4.6　排泄 24
2.6.4.6.1　ラット 24
2.6.4.6.2　イヌ 24

2.6.4.6.3　ヒト 25
2.6.4.6.4　ラットの乳汁排泄 25
2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用 26
2.6.4.7.1　ベルイシグアトの消失に関わる薬物代謝酵素 26
2.6.4.7.1.1　ベルイシグアトの酸化的代謝に関わる CYP 分子種の同定 26
2.6.4.7.1.2　ベルイシグアトのグルクロン酸抱合に関わる UGT 分子種の同定 26
2.6.4.7.1.3　UGT 阻害薬がベルイシグアトのグルクロン酸抱合に与える影響 27
2.6.4.7.2　薬物代謝酵素の阻害 27
2.6.4.7.3　チトクローム P450（CYP）酵素の誘導 29
2.6.4.7.4　ベルイシグアトの分布におけるトランスポーターの役割 29
2.6.4.7.4.1　Caco-2 細胞におけるベルイシグアト及び M-1 の細胞膜透過性 29
2.6.4.7.4.2　ベルイシグアト及び M-1 の排出トランスポーターに対する基質特性 29
2.6.4.7.4.3　ベルイシグアト及び M-1 の取込みトランスポーターに対する基質特性 30
2.6.4.7.5　トランスポーターの阻害 31
2.6.4.7.5.1　ベルイシグアト及び M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用 31
2.6.4.7.5.2　ベルイシグアト及び M-1 の取込みトランスポーターに対する阻害作用 32
2.6.4.8　その他の薬物動態試験 32
2.6.4.9　考察及び結論 33
2.6.4.10　図表 35
引用文献一覧 35

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
ADME	Absorption Distribution Metabolism Excretion	吸収・分布・代謝・排泄
AGP	Alpha 1-acid glycoprotein	α_1－酸性糖タンパク
AUC	Area under the (plasma) concentration vs time curve, Area under the (plasma) concentration vs time curve from zero to infinity	（血漿中）濃度－時間曲線下面積、投与 0 時間から無限大時間までの（血漿中）濃度－時間曲線下面積
AUC(0-x)	Area under the plasma concentration vs time curve from zero to x hours	投与 0 時間から投与 x 時間後までの（血漿中）濃度－時間曲線下面積
AUC_{norm}	AUC normalized to dose	投与量及び体重で標準化した AUC
AUCR	AUC ratio	AUC 変化率
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	乳癌耐性タンパク
BCS	Biopharmaceutical Classification System	生物薬剤学的分類システム
BDC	Bile Duct-Cannulated	胆管カニュレーション
BSEP	Bile Salt Export Pump	胆汁酸排泄ポンプ
C_{blood}/C_{plasma}	Blood to Plasma Ratio	血液中と血漿中の濃度比
C_{max}	Maximum Drug Concentration (in Plasma)	（血漿中）最高濃度
$C_{max, norm}$	Cmax normalized to dose	投与量及び体重で標準化した C_{max}
CL	Clearance	クリアランス
CV	Coefficient of Variation	変動係数
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DDI	Drug-Drug Interaction	薬物相互作用
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
FCS	Fetal Calf Serum	ウシ胎仔血清
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GIT	Gastrointestinal Tract	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
h	Hour(s)	時間
HLM	Human Liver Microsomes	ヒト肝ミクロソーム
HPLC	High Pressure (Performance) Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー

略語	英語名称	日本語名称
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry	高分解能質量分析
HSA	Human Serum Albumin	ヒト血清アルブミン
IC_{50}	Concentration Required for 50% Inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonization	医薬品規制調和国際会議
IV	Intravenous(ly)	静脈内
k_a	Absorption Rate Constant	吸収速度定数
K_i	Inhibition Constant	阻害定数
K_m	Michaelis-Menten Constant	ミカエリス-メンテン定数
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry	高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
LLC-PK1	Lewis Lung Carcinoma Pork Kidney cell line	ルイス肺癌ブタ腎尿細管上皮細胞株
L-MDR1	Multidrug Resistance Protein 1-Transfected LLC-PK1	多剤耐性輸送タンパク発現 LLC-PK1
LLOQ	Lower Limit of Quantitation	定量下限
LSC	Liquid Scintillation Counting	液体シンチレーションカウンター
MATE	Multidrug and Toxin Extrusion	－
MBq	Megabecquerel	メガベクレル
MDCKII	Madin Darby Canine Kidney Cell Line II	Madin Darby イヌ腎細胞
min	Minute(s)	分
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium Iodide	－
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	メッセンジャーリボ核酸
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
n.a.	Not Applicable	該当せず
n.c.	Not Calculated	算出せず
n.d.	Not Determined	検出せず
NMR	Nuclear magnetic Resonance	核磁気共鳴
OAT	Organic Anion Transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic Cation Transporter	有機カチオントランスポーター
P_{app}	Apparent Permeability Coefficient	見かけの膜透過係数

略語	英語名称	日本語名称
PEG	Polyethylene Glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-Glycoprotein	P-糖タンパク
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PO	Per os, per oral(ly)	経口
QD	Quaque die (lat.), once a day	1日1回
QWBA	Quantitative Whole-Body Autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RIS	Relative Induction Score	－
Sec.	Section	項
sGC	Soluble Guanylate Cyclase	可溶性グアニル酸シクラーゼ
SOP	Standard Operating Procedure	標準操作手順書
t_{max}	Time to Reach Maximum Drug Concentration (in Plasma)	最高（血漿中）濃度到達時間
$t_{½}$	Half-life	消失半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
UDPGA	Uridine-5'-diphospho glucuronic acid	ウリジン5'－二リン酸グルクロン酸
UGT	Uridine-5'-diphospho glucuronosyltransferase	ウリジン5'－二リン酸グルクロン酸転移酵素
ULOQ	Upper Limit of Quantification	定量上限
V_{ss}	Volume of Distribution at Steady State	定常状態における分布容積

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

ベルイシグアト（BAY 1021189 又は MK-1242）は、慢性心不全の治療薬として開発された可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）刺激薬である。マウス、ラット及びイヌを用いて、ベルイシグアトの吸収・分布・代謝・排泄を検討した。また、ヒトにおける血漿タンパク結合、血球／血漿分配、並びに *in vitro* 及び *in vivo* 代謝を検討し、非臨床動物とヒトの種間比較をした。更に、*in vitro* において、代謝酵素及びトランスポーターが関わる薬物動態学的薬物相互作用の可能性を評価した。実施した非臨床薬物動態試験の一覧を 2.6.5.1-1 に示す。

非臨床動物種を用いた薬物動態試験において、エタノール：ポリエチレングリコール（PEG）400：水〔10：40：50（v/v/v）〕を投与媒体としてベルイシグアトの投与液を調製した。ラットに[^{14}C]ベルイシグアト（図 2.6.4.2- 1）を投与し、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験を実施した。*In vitro* 試験、並びに *in vivo* の代謝及び排泄試験では、すべての動物種において[^{14}C]ベルイシグアトを用いた。

ベルイシグアトのクリアランスは低く、ラット及びイヌにおける血漿クリアランスは、それぞれ 0.21L/(kg·h)及び 0.15L/(kg·h)で、血液クリアランスは 0.27L/(kg·h)及び 0.17L/(kg·h)であった。分布容積は、ラット及びイヌで中程度（それぞれ約 0.8 及び 1.1L/kg）であった。ベルイシグアトの血漿からの消失半減期は、ラット（約 2～3 時間）及びイヌ（約 5 時間）で中程度であった。経口バイオアベイラビリティは、ラットでは中程度（約 40%～50%）、イヌでは高かった（約 70%）。

ベルイシグアト及び代謝物 M-1〔ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合体、BAY 1222707 とも称する。以下、M-1 と称する（図 2.6.4.2- 2）〕の血漿タンパク結合は動物種依存的であった。ベルイシグアトの血漿中非結合型分率は、7.99%（マウス）、4.55%（ラット）、10.2%（イヌ）及び 2.18%（ヒト）で、M-1 の血漿中非結合型分率は 15.2%（マウス）、3.13%（ラット）、15.2%（イヌ）及び 1.63%（ヒト）であった。ベルイシグアトのウサギ血漿中非結合型分率は、3.69%であった。ベルイシグアトは、主にヒト血清アルブミンと結合し、ラット、イヌ及びヒトの血液中において、血漿に選択的に分布した。

ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、放射能は副腎皮質、腎皮質、腎髄質、腎髄質外側部、肝臓及びハーダー腺に多く分布した。脳中放射能濃度は血液中濃度の約 2%～3%で、これは脳試料における一般的な残留血液体積を考慮して算出した濃度比と同程度であることから、血液脳関門通過性は非常に低いことが示唆された。有色 Long Evans ラットでは、メラニン含有組織〔有色眼球壁、副腎（特に副腎皮質）、皮膚の濃い有色部〕における放射能濃度が高く、放射能のメラニンに対する結合が示唆された。脈絡叢及び髄膜（黒質）の有色部分においても、おそらくメラニン結合に起因すると考えられる高い放射能濃度が検出された。メラニン含有組織において高いベルイシグアト濃度が認められたが、有色 Long Evans ラットの 13 週間反復投与毒性試験では、毒性はみられなかった（2.6.6.8.3.2）。妊娠ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを投与した組織分布試験において、放射能は血液胎盤関門を通過した（胎児の血液中放射能曝露量は、母動物の血液中曝露量の 67%）。放射能は、大部分の末梢臓器・組織及び胎児組織に速やかにかつ広く分布した。残存放射能は大部分の臓器・組織から速やかに消失したことから、ベルイシグアトを反復投与した場合に、母体及び胎児の組織中における蓄積はほとんどない又はないと考えられる。

マウス、ラット及びイヌに[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与したとき、血漿中放射能の大部分は未変化体〔総放射能濃度－時間曲線下面積（AUC）の＞97%〕で、微量成分として代謝物 M-

1 が認められた。一方、ヒト血漿中では、代謝物 M-1 が主要な成分として認められ、総放射能 AUC の 72%を占めたのに対し、未変化体は 27%であった。M-1 には sGC に対する薬理活性はなく、オフターゲット作用も有していない。

非臨床動物種及びヒトにおいて、ベルイシグアトは、主に代謝及び未変化体の排泄によって消失する。胆管カニュレーション（BDC）ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、酸化代謝物（投与量の約 12%）とグルクロン酸抱合体（M-1：投与量の約 13%）の両方が胆汁中及び尿中に認められた。胆汁中及び尿中に排泄された未変化体は全体で投与量の約 9%を占めた。BDC ラットに静脈内投与したとき、投与量の約 30%が糞中から回収され、その大部分が未変化体であったことから、相当量のベルイシグアトが消化管分泌されることが示唆された。無処置のイヌに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、投与量の大部分（89.2%）が糞中に排泄され、投与量の約 4.4%のみが尿中に排泄された。イヌにおいて、グルクロン酸抱合による M-1 の生成が主要な代謝経路で（M-1：糞中に投与量の約 51%、尿中に投与量の約 0.4%が排泄された）、酸化的代謝は副次的経路であった（投与量の約 8%が排泄された）。糞中及び尿中に排泄された未変化体は、それぞれ投与量の約 19%及び約 2.4%であった。ヒトに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、主要な代謝経路はグルクロン酸抱合（M-1：投与量の 41%が尿中に排泄された）で、酸化的代謝はごくわずかであった（投与量の 3.5%のみが排泄された）。糞中において M-1 は認められなかった。糞中の未変化体（投与量の約 43%）は、未変化体の直接胆汁中排泄／消化管分泌、及び／又は腸管内での M-1 の加水分解に由来すると考えられる。したがって、グルクロン酸抱合は、ヒトにおいて総クリアランスの 41%超寄与している可能性がある。非臨床動物種と同様に、ヒトにおいて未変化体の腎排泄は副次的な消失経路であった（投与量の約 9%）。

In vivo データと合致して、ラット、イヌ及びヒトの肝細胞を用いた *in vitro* 試験において、ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合（M-1 を生成）が主要な代謝経路であった。一方、N－脱アルキル体及び複数の水酸化代謝物を生成する酸化的代謝は、ラットにおいて最も顕著で、イヌではそれほど顕著ではなく、ヒト肝細胞ではほとんど認められなかった。

In vitro の検討において、ベルイシグアトのグルクロン酸抱合は主にウリジン 5'－二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）1A9 及び UGT1A1 によって触媒された。ウリジン 5'－二リン酸グルクロン酸（UDPGA）存在下のヒト肝、腎及び腸ミクロソームにおいて、ベルイシグアトのグルクロン酸抱合が触媒された。単一ドナー由来のヒト肝ミクロソーム（n＝20）を用いた試験において、M-1 の生成は、高選択性の UGT1A9 を介した経路であるプロポフォールのグルクロン酸抱合の程度と良い相関を示し（r^2＝0.73）、高選択性の UGT1A1 を介した経路であるエストラジオールのグルクロン酸抱合の程度との相関（r^2＝0.61）よりもわずかに良い相関を示した。また、ヒト肝ミクロソームにおいて、UGT1A9 阻害薬ニフルム酸によるベルイシグアトのグルクロン酸抱合の阻害は、UGT1A1 阻害薬アタザナビルよりもわずかに強かったことから、ベルイシグアトのグルクロン酸抱合は、UGT1A1 よりも UGT1A9 によって選択的に触媒されると考えられる。更に、メフェナム酸（UGT1A9 阻害薬）を用いた臨床薬物相互作用試験において、ベルイシグアトの薬物動態に対して臨床的に意味のある影響はみられなかった（2.7.2.3.4.1.2）。

In vitro において、ベルイシグアトは高膜透過性で、P-糖タンパク（P-gp）及び乳癌耐性タンパク（BCRP）の基質である。ベルイシグアトは有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3 及び有機カチオントランスポーター（OCT）1 の基質ではない。代謝物 M-1 は排出トランスポーター（P-gp、BCRP）及び取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3）の基質ではない。ヒトにおける高い経口バイオアベイラビリティ（93%）（2.7.2.3.1.1）を考慮すると、P-gp 及び BCRP がベルイシグアトの吸収過程に寄与している可能性は低い。一方、ヒトにおいて、P-gp 及び BCRP がベルイシグアトの胆汁中排泄／消化管分泌に関与している場合には、P-gp 及び BCRP の阻害薬又は誘導薬と併用したとき、ベルイシグアトは薬物相互作用を受ける可能性がある。しかし、ケトコナゾール（広範なトランスポーター阻害薬）を用いた臨床薬物相互作用試験において、ベルイシグアトの薬物動態に対する影響はわずかであった（2.7.2.2.4.1.2.1）。また、リ

ファンピシン〔トランスポーター、チトクローム P450（CYP）及び UGT の誘導薬〕を用いた臨床薬物相互作用試験においても、ベルイシグアトの曝露量に対する影響はわずかであった（2.7.2.2.4.1.2.3）。以上のことから、ベルイシグアトが被相互作用薬となる可能性は低い。

ベルイシグアト及びヒト血漿中の主要な代謝物 M-1 が相互作用薬となる可能性は低い。*In vitro* 試験において、ベルイシグアト及び M-1 は、主要なヒト CYP 分子種［CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、2J2 及び 3A4〔50%阻害濃度（IC_{50}）＞50μM〕］及び UGT 分子種〔UGT1A1、1A4、1A6、2B4 及び 2B7（IC_{50} ＞50μM）〕に対して阻害作用を示さなかった。ベルイシグアト及び代謝物 M-1 は、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験で、臨床有効濃度において CYP1A2、2B6 及び 3A4 に対して誘導作用を示さなかった。更に、ベルイシグアト及び M-1 は、検討した最高濃度において、排出トランスポーターの P-gp 及び胆汁酸排泄ポンプ（BSEP）（IC_{50} ＞100μM）、multidrug and toxin extrusion（MATE）1 及び MATE2-K（IC_{50} ＞10μM）、並びに取込みトランスポーターの OCT1（IC_{50} ＞50μM）、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3 及び OCT2（IC_{50} ＞5μM）を阻害しなかった。ベルイシグアトは、CYP1A1（IC_{50}＝2.9μM）、UGT1A9〔IC_{50}＝10.6μM、阻害定数（K_i）＝6.6μM〕、BCRP（IC_{50}＝20μM）、並びに OATP1B1（IC_{50}＝約 16μM）及び OATP1B3（IC_{50}＝約 30μM）を阻害した。また、M-1 は、CYP1A1（IC_{50}＝9.9μM）、並びに OATP1B1（IC_{50}＝25.6μM）及び OATP1B3（IC_{50}＝16.6μM）を阻害した。しかし、ヒトにベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したときのベルイシグアトの曝露量〔総血漿中最高濃度（総 C_{max}）：0.8μM（＝350μg/L、2.7.2.3.1.6）、非結合型血漿中最高濃度（非結合型 C_{max}）：0.02μM、肝臓入り口血液中の推定非結合型最高濃度：0.03μM〕、及び代謝物 M-1 の曝露量〔総 C_{max}：2.7μM（＝1,610μg/L、2.7.2.3.1.3.1）、非結合型 C_{max}：0.04μM〕を考慮すると、カットオフ基準による評価又は静的薬物速度論（MSPK）モデルによる評価において基準値を下回ったことから、ベルイシグアト及び代謝物 M-1 はこれらの酵素及びトランスポーターの基質と併用したとき、薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられる。

2.6.4.2　分析法

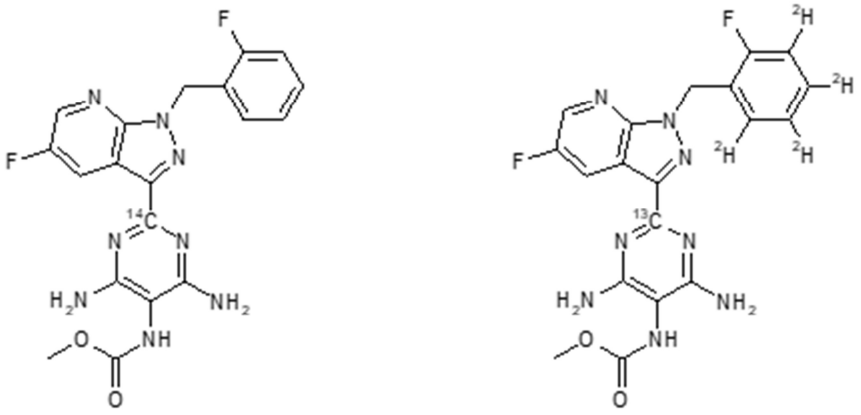
2.6.4.2.1　　ベルイシグアト及び代謝物 M-1 の同位体標識

2.6.4.2.1.1　[^{14}C]ベルイシグアト及び[^{13}C,^{2}H$_4$]ベルイシグアトの合成

参照項目：　4.2.2.1.2 A52574
4.2.2.1.3 A52866

ベルイシグアトのピリミジン基を ^{14}C で標識した。標識は常法に従い実施した（4.2.2.1.2 A52574）。最終産物をクロマトグラフィーにより精製し、比放射能 4.42MBq/mg の[^{14}C]ベルイシグアトを得た。後継ロットには非標識ベルイシグアトを添加し、比放射能 2.85MBq/mg に調整した。

図 2.6.4.2- 1　[^{14}C]ベルイシグアト及び[^{13}C,^{2}H$_4$]ベルイシグアトの構造



^{14}C 標識は代謝的に安定であることが示された。ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与後 24 時間までに呼気中に排出された放射能は、すべて定量下限（LLOQ）未満であったことから、投与放射能は $^{14}CO_2$ として呼気中に排出されないことが示された（2.6.5.13-1）。

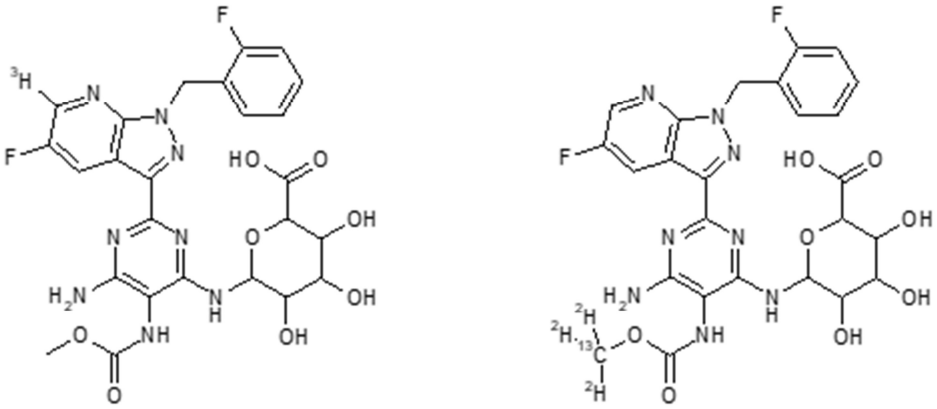
また、同位体純度 97.3%の[^{13}C,^{2}H$_4$]ベルイシグアトを得た（4.2.2.1.3 A52866）。

2.6.4.2.1.2　[^{3}H]M-1 及び[^{13}C,^{2}H$_3$]M-1 の合成

参照項目：4.2.2.1.4 PH-38754

代謝物 M-1 のシリルエステル生成、及びそれに続くロジウム黒触媒による水素-トリチウム交換反応により、78.1MBq の[^{3}H]M-1 を生成し、比放射能は 157.4MBq/mg であった（4.2.2.1.4 PH-38754）。

図 2.6.4.2- 2　[^{3}H]M-1 及び[^{13}C,^{2}H$_3$]M-1 の構造



アセトニトリル／緩衝液（pH7）混合液中で、[^{13}C,^{2}H$_3$]ベルイシグアトを D-グルクロン酸と反応させ、同位体純度 99%超の[^{13}C,^{2}H$_3$]M-1 を得た（4.2.2.1.4 PH-38754）。

2.6.4.2.2　総放射能の定量

体液、臓器・組織及び排泄物中の放射能濃度を、適切な前処理後に液体シンチレーションカウンター（LSC）法により定量した。定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験では、phosphor-imaging 法（ラジオルミノグラフィー）により組織中放射能濃度を定量した。いずれの分析法においても、検出された総放射能はベルイシグアト及びその放射性代謝物を含む。

2.6.4.2.3　血漿中ベルイシグアト及び M-1 の定量

トキシコキネティクス（TK）試験では、血漿中ベルイシグアト（すべての毒性試験）及び M-1（がん原性試験のみ）濃度を、除タンパク後に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）-タンデム質量分析（LC-MS/MS）法を用いて定量した。各試験でベルイシグアト及び M-1 の定量に用いた生体試料分析法を 2.6.5.2-1 に要約する。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）下で実施した試験で用いた生体試料分析法は、米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）の生体試料分析法バリデーションに関するガイダンス／ガイドラインに従いバリデーションを実施した。マウス、ラット、ウサギ及びイヌの血漿中ベルイシグアト濃度測定における LLOQ は 1～5μg/L の範囲で、定量上限（ULOQ）は 1000μg/L であった。マウス及びラットの血漿中 M-1 濃度測定における LLOQ はそれぞれ 2 及び 5μg/L で、ULOQ は 1000μg/L であった。分析法及びバリデーション報告書を 2.6.5.2-2 に要約する。

薬物動態試験については、社内標準操作手順書（SOP）、並びに FDA 及び EMA の生体試料分析法バリデーションに関するガイダンス／ガイドラインに従い分析法のバリデーション及び試験試料の分析を実施した。

2.6.4.2.4　代謝物プロファイリング

代謝物プロファイリングでは、試料を HPLC で分離後、オフラインの LSC で放射能を測定した。代謝物の構造解析には HPLC-高分解能質量分析（HRMS）法を用い、精密質量及び MS/MS の壊裂パターンに基づいて代謝物の構造を推定した。M-1 の構造は、核磁気共鳴（NMR）分析により解析し、合成標準品との比較により確認した。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 単回投与後の薬物動態

2.6.4.3.1.1 ラット

参照項目：4.2.2.2.1 PH-37467

雄性 Wistar ラットにベルイシグアトを単回静脈内及び経口投与したときの薬物動態パラメータをそれぞれ表 2.6.4.3- 1 及び表 2.6.4.3- 2 に示す。また、血漿中濃度の経時的推移を図 2.6.4.3- 1 に示す。

表 2.6.4.3- 1 ラットにベルイシグアトを単回静脈内（ボーラス）投与したときの薬物動態パラメータ

Dose	(mg/kg)	0.3	1[a]
AUC	(μg·h/L)	1300	5220
AUC_{norm}	(kg·h/L)	4.32	5.22
CL	(L/(kg·h))	0.232	0.192
V_{ss}	(L/kg)	0.789	0.795
$t_{½}$	(h)	2.45	3.09

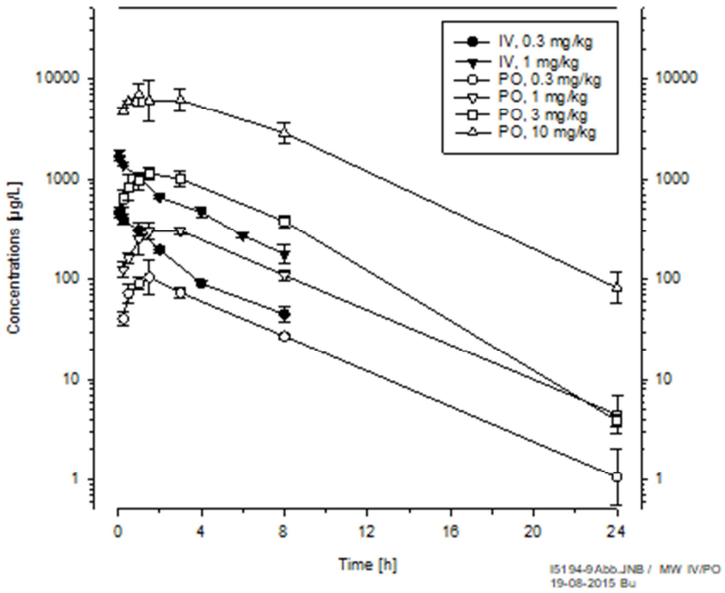
Plasma was obtained by terminal bleeding (N=3 per time point). Values were calculated from the geometric mean concentration vs time profile. As such, standard deviation could not be calculated.
[a] [^{14}C]vericiguat was administered; vericiguat concentrations were determined by LC-MS/MS.
[2.6.5.3-1]

表 2.6.4.3- 2 ラットにベルイシグアトを単回経口投与したときの薬物動態パラメータ

Dose	(mg/kg)	0.3	1	3[a]	10
AUC	(μg·h/L)	606	2250	7410	52100
AUC_{norm}	(kg·h/L)	2.02	2.25	2.47	5.21
C_{max}	(μg/L)	104	305	1140	6980
$C_{max, norm}$	(kg/L)	0.345	0.305	0.382	0.698
t_{max}	(h)	1.50	3.00	1.50	1.00
Bioavailability[b]	(%)	38.8	43.1	47.3	99.9

Plasma was obtained by terminal bleeding (N=3 per time point). Values were calculated from the geometric mean concentration vs time profile. As such, standard deviation could not be calculated.
[a] [^{14}C]vericiguat was administered; vericiguat concentrations were determined by LC-MS/MS.
[b] Oral bioavailability was calculated relative to the AUC_{norm} at 1 mg/kg IV.
[2.6.5.3-1]

図 2.6.4.3- 1　Wistar ラットにベルイシグアトを単回静脈内及び経口投与したときの血漿中濃度の経時的推移



[4.2.2.2.1 PH-37467]

ラットにおいて、ベルイシグアトの平均血漿クリアランスは 0.21L/(kg·h)、血液クリアランス〔血液中と血漿中の濃度比（血液／血漿）0.792（2.6.4.4.4）を用いて算出〕は 0.27L/(kg·h)であった。これは肝血流速度の約 6%（＝肝抽出率）に相当することから、ラットにおいて、ベルイシグアトは低クリアランス化合物であり、肝臓における抽出はわずかであると示唆される。ラットでは、定常状態における分布容積（V_{ss}）は中程度（約 0.8L/kg）で、終末相における消失半減期は約 2～3 時間であった。静脈内投与後の薬物動態は 0.3～1 mg/kg の範囲で線形であった。

ベルイシグアトを経口投与したとき、吸収は非常に速く、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は 1～3 時間の範囲であった。ベルイシグアトの曝露量は、3mg/kg まで用量比例的に増加し、経口バイオアベイラビリティは中程度であった（0.3～3mg/kg で約 40%～50%）。3～10mg/kg の範囲では、用量比を上回る曝露量の増加がみられた。しかし、ラットの毒性試験において、3～30mg/kg/日の範囲で用量比例的な血漿中 AUC の増加がみられ（2.6.6.3.2.3）、試験間でばらつきがある可能性が示唆された。

2.6.4.3.1.2　イヌ

参照項目：　4.2.2.2.2 A50440
　　4.2.2.2.3 PH-38159

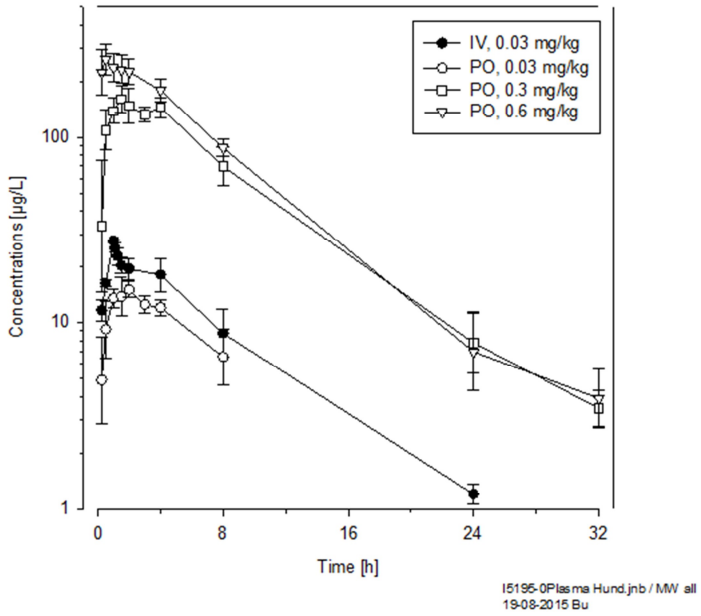
雌性ビーグル犬にベルイシグアトを単回静脈内投与（点滴静注）及び経口投与したときの薬物動態パラメータを表 2.6.4.3- 3 に示す。また、血漿中濃度の経時的推移を図 2.6.4.3- 2 に示す。

表 2.6.4.3- 3　イヌにベルイシグアトを単回静脈内投与（点滴静注）及び経口投与したときの薬物動態パラメータ

Administration Route		IV	PO	PO	PO
Dose	[mg/kg]	0.03	0.03	0.3	0.6[a]
AUC	(µg·h/L)	197 (1.20)	141 (1.24)	1472 (1.12)	1950 (1.11)
AUC_{norm}	(kg·h/L)	6.57 (1.20)	4.71 (1.24)	4.91 (1.12)	3.25 (1.11)
C_{max}[b]	(µg/L)	27.6 (1.02)	16.1 (1.12)	167 (1.15)	262 (1.21)
$C_{max, norm}$	(kg/L)	0.919 (1.02)	0.535 (1.12)	0.556 (1.15)	0.437 (1.21)
t_{max}	(h)	1.00 (1.00)	1.44 (1.42)	1.82 (1.18)	0.500 (1.00)
CL	(L/(kg·h))	0.152 (1.20)	n.a.	n.a.	n.a.
V_{ss}	(L/kg)	1.14 (1.17)	n.a.	n.a.	n.a.
$t_{½}$	(h)	5.39 (1.03)	5.67 (1.22)	6.95 (1.51)	4.94 (1.13)
Bioavailability	(%)	n.a.	71.6 (1.09)	74.7 (1.19)	n.c.

Values represent geometric mean (geometric standard deviation) (N=3 or 4 animals).
[a] [^{14}C]vericiguat was administered; vericiguat concentrations were determined by LC-MS/MS.
[b] C_{max} following one-hour IV infusion was observed at the end of infusion.
n.a. = not applicable.
n.c. = not calculated.
[2.6.5.3-2]

図 2.6.4.3- 2　ビーグル犬にベルイシグアトを単回静脈内及び経口投与したときの血漿中濃度の経時的推移



[4.2.2.2.2 A50440, 4.2.2.2.3 PH-38159]

イヌにおいて、ベルイシグアトの血漿クリアランスは低く〔0.15L/(kg·h)〕、分布容積は中程度（1.1L/kg）、終末相における消失半減期は中程度（約 5 時間）であった。血液中と血漿中の濃度比（血液／血漿）0.874（2.6.4.4.4）を用いて算出した血液クリアランスは 0.17L/(kg·h)で、これは肝血流速度の約 8%（＝肝抽出率）に相当した。経口投与したとき、ベルイシグアトは速やかに吸収され、t_{max} は 0.5～1.8 時間の範囲であった。ベルイシグアトの経口バイオアベイラビリティは、0.03～0.3mg/kg の用量範囲で高かった（約 70%）。

2.6.4.3.2 反復投与後の薬物動態

ベルイシグアトを反復投与したときの薬物動態試験は実施しなかった。毒性試験の一環として実施したマウス、ラット及びイヌの曝露量測定の結果から反復投与後の薬物動態パラメータが得られている（2.6.6.3）。

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 臓器・組織分布

2.6.4.4.1.1 アルビノラット

参照項目：4.2.2.3.1 A50459

雌雄アルビノラット（Wistar ラット）に[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与（3mg/kg）し、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）により放射能（未変化体及び代謝物）の臓器・組織における分布及び消失を検討した。投与媒体にはエタノール：PEG400：水〔10：40：50 (v/v/v)〕を用いた。雄性 Wistar ラットでは、投与後 1～168 時間まで試料を採取した。雌性 Wistar ラットでは、投与後 2 時間及び 24 時間に試料を採取した。

全身オートラジオグラムの定性的評価において、放射能の分布パターンは雌雄でほぼ同一であった。注目すべき点として、投与後 24 時間の臓器・組織及び血液中の放射能曝露量は雄性ラットよりも雌性ラットの方が高かった（>4 倍）。しかし、ラットの毒性試験のトキシコキネティクスにおいて、血漿中曝露に実質的な性差はみられなかった（<2 倍）（2.6.6.3.2）。放射能は、脳、骨、白色脂肪組織及び精巣を除いて、均一に全身に分布した。すべての試料採取時点において、血液脳関門通過性は非常に低かった（2.6.5.5-1、2.6.5.5.-2、2.6.5.5-3）。

雄性 Wistar ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、大部分の組織で投与後 2～4 時間に最高放射能濃度に達した。消失は速やかに起こり、臓器・組織における見かけの消失半減期は 1.5～3 時間の範囲であった。投与後 3 日目には、すべての臓器・組織中の放射能濃度は、LLOQ（3～4μg-eq/L）付近又は大半が LLOQ 未満となった。t_{max} における放射能濃度が最も高かった組織は、腎皮質、腎髄質外側部及び副腎皮質（血液の 5～6 倍）、並びに肝臓、ハーダー腺及び腎髄質（血液の 2～3 倍）であった。最も放射能濃度が低かったのは、脳及び骨であった。脳中放射能濃度は、血液中濃度の約 2%～3%で、これは脳試料における一般的な残留血液体積を考慮して算出した濃度比と同程度であることから、脳組織への分布は極めて低いことが示唆された。組織中の放射能 AUC についても同様の結果が得られた。血漿中 AUC は血液中 AUC の 1.5 倍であったことから、放射能の血球への移行は限定的であることが示唆され、*in vitro* における血液中と血漿中の濃度比（血液／血漿）と合致していた（2.6.4.4.4）。最も高い放射能曝露量は、消化管内容物及び一時的に膀胱内容物でみられ、これらは胆汁中、消化管中及び尿中への排泄が消失経路であったことと合致していた（2.6.4.6.1）。

2.6.4.4.1.2 有色ラット

参照項目：4.2.2.3.2 PH-38309

雄性有色ラット（Long Evans ラット）に[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与（3mg/kg）し、放射能の臓器・組織分布、特にメラニン含有組織における放射能の分布を評価した。投与後 1 時間～336 時間まで試料を採取した。

メラニンが関与する分布を除いて、有色ラットにおける放射能の分布パターンは、雄性アルビノラット（Wistar ラット）とほぼ同様であった。有色組織において最も高い曝露がみられ、総放射能 AUC は、有色眼球壁（血液の＞100 倍）、皮膚の濃い有色部（血液の約 8 倍）及び副腎（特に副腎皮質で高く、血液の約 5 倍）の順で高かった。皮膚の薄い有色部及び骨格筋における放射能の曝露量は、血液よりも低かった（それぞれ血液の 0.64 倍及び 0.77 倍）。これらの放射能のメラニンに対する結合を示す結果と合致して、脈絡叢及び髄膜（黒質）の有色部において高い放射能濃度がみられた。投与後 24 時間の残留放射能の総量は投与量のわずか 0.64%で、主に皮膚の有色部に局在していた。メラニン含有組織における消失には長時間を要し、終末相半減期は有色眼球壁が約 161 時間、皮膚の濃い有色部が 344 時間であった（2.6.5.5-4、2.6.5.5-5）。

以上の結果から、放射能のメラニン含有組織に対する特異的な親和性が示唆された。続いて、有色ラット（Long Evans ラット）の 13 週間反復投与毒性試験を実施し、メラニン含有組織におけるベルイシグアトの蓄積に対する安全性を評価した。この試験において関連する毒性はみられなかった（2.6.6.8.3.2）。ベルイシグアトは波長 290～720nm の光を吸収することから、*in vitro* 光毒性試験を実施し、光毒性を示さないことが示唆された（2.6.6.8.7）。

2.6.4.4.2　胎盤通過性

2.6.4.4.2.1　ラット

参照項目：4.2.2.3.3 R-9666

妊娠 Wistar ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを妊娠 19 日目に単回経口投与（3mg/kg）し、ベルイシグアトの胎盤通過性について検討した。QWBA により胎児及び母動物の血液及び組織中の放射能濃度を定量した。投与後 1～48 時間まで試料を採取した。

妊娠ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したときの母動物における放射能の分布パターンは、非妊娠ラットと極めて類似していた。放射能は速やかに吸収され、投与後 4 時間には大部分の母動物の臓器・組織で最高濃度に達し、投与後 8 時間には大部分の生殖組織及び胎児組織で最高濃度に達した。放射能は、母動物の血液から速やかかつ広範に、大部分の末梢臓器・組織及び胎児組織に分布したが、脳、脊髄、眼球（水晶体、硝子体液）及び羊水の放射能濃度は血液中の 9 分の 1 未満であった。最も放射能曝露量が高かったのは、盲腸（盲腸壁：血液の 16.6 倍）、小腸（小腸壁：血液の 17.5 倍）、副腎（皮質：血液の 8.9 倍）及び副腎（全体の平均：血液の 8.1 倍）であった。羊膜、膀胱、胃（胃粘膜）、腎臓（髄質外側部）、ハーダー腺及び肝臓の放射能曝露量は、血液の約 3～7 倍であった。最も放射能曝露量の低かった組織は、羊水、骨、脂肪（白色）、眼球（水晶体、硝子体液）、脳（全体の平均）及び脊髄であった（2.6.5.7-1、2.6.5.7-2、2.6.5.7-3）。残存放射能は大部分の臓器・組織から速やかに消失したことから、ベルイシグアトを反復投与した場合に、母体及び胎児の組織中における蓄積はほとんどない又はないと考えられる。

胎児の血液中放射能 AUC(0-48)は、母動物の血液中放射能 AUC(0-48)の 67%であり、放射能が胎盤を通過することが示された。胎児と母動物の放射能曝露比（胎児／母動物）は、骨格筋では 0.9 であったが、脳ではより高く 5.8 であった。これはおそらく、血液脳関門における排出トランスポーターの発現レベルが胎児と母動物とで異なるためであると考えられる。

2.6.4.4.2.2　ウサギ

実施していない。

2.6.4.4.3　*In vitro*血漿タンパク結合

参照項目：4.2.2.3.4 A50454
4.2.2.3.5 PH-38631
4.2.2.3.6 PH-39106
4.2.2.3.7 PH-41292

ベルイシグアトの血漿タンパクに対する可逆的結合は、動物種依存的で、血漿中非結合型分率は 2.18%（ヒト）～10.2%（ビーグル犬）の範囲であった。ヒト血漿では、約 10,000μg/L の濃度のときわずかに高い非結合型分率（4.05%）がみられた（表 2.6.4.4- 1）。しかし、この濃度は、心不全患者にベルイシグアトを 10mg の用量で 1 日 1 回投与したときの臨床有効濃度範囲（総 C_{max}：350μg/L、2.7.2.3.1.6）を上回っていた。

ベルイシグアトは、ヒト血漿において、主にヒト血清アルブミンと結合した。α_1－酸性糖タンパク（AGP）、α－グロブリン、γ－グロブリンのタンパク結合に対する寄与はわずかであった。ヒト肝ミクロソーム（HLM）、並びに CYP1A1、UGT1A1 及び UGT1A9 発現系のインキュベーション溶液における非結合型分率を評価し（表 2.6.4.4- 1）、*in vitro* で薬物相互作用及び酵素反応速度論パラメータを検討した試験において、非結合型 IC_{50}及び非結合型 K_iを算出した。

代謝物 M-1 の血漿タンパク結合も動物種依存的で、血漿中非結合型分率は 1.63%（ヒト）～15.2%（CD-1 マウス、ビーグル犬）の範囲であった（表 2.6.4.4- 1）。

表 2.6.4.4- 1 *In vitro*におけるベルイシグアト及び M-1 の各種動物血漿及びマトリックスに対する可逆的タンパク結合

Species/Matrix	Vericiguat Concentration (μg-eq/L)	Mean Percent Unbound (%)	M-1 Concentration (μg/L)	Mean Percent Unbound (%)
CD-1 mouse	93.2 to 9327	7.99	130 to 9479	15.2
Wistar rat	93.1 to 9425	4.55	114 to 10248	3.13
CHBB HM rabbit	94.3 to 9078	3.69	-	-
New Zealand White rabbit	-	-	102 to 9743	4.48
Beagle dog	93.8 to 9234	10.2	113 to 11326	15.2
Cynomolgus monkey	93.5 to 9278	5.55	-	-
Human	92.3 to 936	2.18	627 to 10161	1.63
Human	9395	4.05	-	-
HSA (40 mg/mL)	899	5.03	-	-
AGP (0.7 mg/mL)	874	66.9	-	-
α-Globulin (12 mg/mL)	890	33.6	-	-
γ-Globulin (10 mg/mL)	877	53.0	-	-
Williams Medium+FCS	93.0 to 9718	49.5	132 to 12999	18.8
HLM (0.05 mg/mL)	92.0, 707, 8108	80.4, 56.7, 39.5	775, 87048	92.4
HLM (0.1 mg/mL)	98.0, 680, 8194	73.7, 50.6, 34.1	820, 89090	89.7
HLM (0.5 mg/mL)	77.8, 897, 9298	55.3, 31.3, 19.6	842, 63669	88.1
rCYP1A1 (10 pmol/mL)	408, 3467	63.7, 34.6	-	-
rUGT1A1 (0.5 mg/mL)	204	49.7	-	-
rUGT1A9 (0.2 mg/mL)	83.7	66.7	-	-

- = Not studied.
HSA = human serum albumin.
AGP = Alpha 1-acid glycoprotein.
FCS = fetal calf serum.
HLM = human liver microsomes.
rCYP1A1 = recombinant cytochrome P450 1A1.
rUGT1A1 = recombinant uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1.
rUGT1A9 = recombinant uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A9.
[2.6.5.6-1]

2.6.4.4.4 *In Vitro*血液／血漿分配

参照項目：4.2.2.3.4 A50454

ヘパリン添加新鮮血液を用いて、ベルイシグアトの血液／血漿分配を評価した。血液中と血漿中の濃度比（血液／血漿）はベルイシグアト濃度に依存せず、ラットで 0.79、イヌで 0.87 及びヒトでは 0.66 であった（表 2.6.4.4- 2）。血液中では、ベルイシグアトは主に血漿中に分布した。

表 2.6.4.4- 2 各種動物血液における[^{14}C]ベルイシグアトの血液中と血漿中の濃度比（血液／血漿）（*in vitro*）

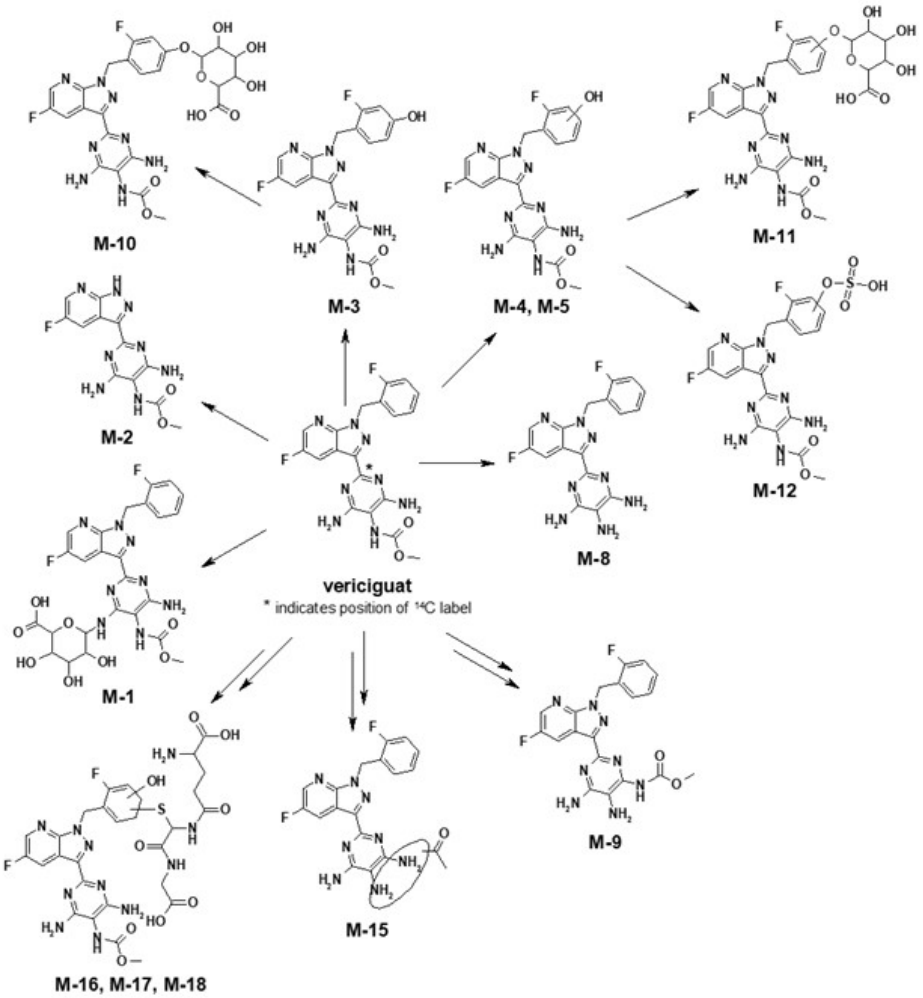
Species	Blood concentration (μg-eq/L)	Plasma concentration (μg-eq/L)	Mean C_{blood}/C_{plasma}
Wistar rat	104 to 10075	151 to 10721	0.792
Beagle dog	86.4 to 3908	98.2 to 4664	0.874
Human	100 to 7949	154 to 11837	0.656

[2.6.5.6-2]

2.6.4.5　　代謝

非臨床動物種及びヒトの肝ミクロソーム（NADPH 添加）及び肝細胞を用いてベルイシグアトの *in vitro* 代謝を検討した。また、マウス、ラット、イヌ及びヒトにおける *in vivo* 代謝を検討した。*In vitro* 及び *in vivo* 代謝試験の結果に基づくベルイシグアトの推定代謝経路を図 2.6.4.5- 1 に示す。

図 2.6.4.5- 1　ベルイシグアトの推定代謝経路



[2.6.5.11-1]

2.6.4.5.1　*In Vivo*代謝

2.6.4.5.1.1　マウス

参照項目：4.2.2.4.1 PH-38984

マウスに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与（1mg/kg）したとき、血漿中放射能の大部分はベルイシグアトであった（総放射能 AUC の＞98%）。M-1（ベルイシグアトの Nーグルクロン酸抱合体）が微量代謝物（1.5%）としてマウス血漿中に認められた（2.6.5.9-1）。

2.6.4.5.1.2　ラット

参照項目：4.2.2.4.2 PH-39035

ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与（3mg/kg）したとき、血漿中放射能の大部分はベルイシグアトであった（総放射能 AUC の＞97%）。M-1 が微量代謝物（1.6%）としてラット血漿中に認められた（2.6.5.9-1）。

無処置ラット（n＝5）に[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与（3mg/kg）、並びに胆管カニュレーション（BDC）ラット（n＝3）に[^{14}C]ベルイシグアトを静脈内投与（1mg/kg）及び経口投与（3mg/kg）し、ベルイシグアトの *in vivo* 代謝を検討した（2.6.5.9-1）。

無処置ラットに経口投与（3mg/kg）したとき、投与放射能の大部分は糞中に排泄され（81.2%）、尿中に排泄されたのは少量（11.4%）であった。糞中放射能の主な成分はベルイシグアトで、投与量の 69.9%を占めた。M-1 及び水酸化体（M-3、M-4 及び M-5）が糞中の主要な代謝物として認められ、投与量の約 9.5%（M-1 と水酸化体の合計）を占めた。尿中放射能の大部分はベルイシグアトであった（投与量の 9.2%）。ラット尿中の M-1 及び M-3 はそれぞれ投与量の 1%未満であった。更に、Nー脱アルキル体（M-2）が微量代謝物として認められた。代謝物 M-15（脱メチル化／脱炭酸／アセチル化によって生じたと推定される）が、尿中において痕跡レベル認められた（表 2.6.4.5- 1）。

BDC ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、酸化代謝物（投与量の約 12%）及び未変化体の Nーグルクロン酸抱合体（M-1、投与量の約 13%）が胆汁及び尿中に排泄された。胆汁及び尿中に排泄された未変化体は、それぞれ投与量の約 5%及び 4%であった（表 2.6.4.5- 1）。BDC ラットに静脈内投与したとき、投与量の約 30%が糞中から回収され、その大部分は未変化体であったことから、相当量のベルイシグアトが消化管分泌されることが示唆された。したがって、経口投与後に糞中で認められた未変化体（投与量の約 35%）は、消化管分泌されたベルイシグアト及び／又は未吸収のベルイシグアトであると考えられる。

排泄物中の代謝物プロファイルは、静脈内投与後と経口投与後で類似していた。

表 2.6.4.5- 1　Wistar ラット（無処置、BDC ラット）に[14C]ベルイシグアトを単回経口投与（3mg/kg）したときの排泄物中のベルイシグアト及び代謝物の割合〔投与量に対する割合（%）〕

Species **Route** **Sampling Interval**	**Intact Rat** **PO** **0-168 h**	**BDC Rat** **PO** **0-24 h**
Urine	**11.4**	**9.88**
vericiguat	9.23	4.07
M-1	0.524	1.66
M-2	0.380	0.388
M-3	0.535	1.27
M-10	-	1.07
M-12/M-15	0.101	0.740
Feces	**81.2**	**36.4**
vericiguat	69.9	35.3
M-1/M-4[a]	5.12	0.146
M-2	-	-
M-3/M-5[a]	4.40	0.910
M-12/M-15	-	-
Bile	**n.a.**	**34.7**
vericiguat	n.a.	5.16
M-1	n.a.	11.2
M-2	n.a.	-
M-3	n.a.	-
M-10	n.a.	2.46
M-11	n.a.	0.564
M-12	n.a.	3.61
M-16	n.a.	1.26
GIT[b]	n.a.	**8.98**
vericiguat	n.a.	8.52
M-3	n.a.	0.323

Numbers represent percentage relative to the administered dose.
- = not detected
[a] The metabolites co-eluted with no baseline separation.
[b] GIT = gastrointestinal tract.
n.a.: not applicable.
[2.6.5.9-1] [2.6.5.13-1]

2.6.4.5.1.3　イヌ

参照項目：4.2.2.4.3 PH-39087

イヌ（n＝4）に[14C]ベルイシグアトを経口投与（0.6mg/kg）したとき、血漿中放射能の大部分はベルイシグアトであった〔総放射能 AUC(0-4)の約 98%〕。イヌ血漿中では、微量代謝物として代謝物 M-1 が認められたが、投与後 4 時間までに血漿中で検出された代謝物は M-1 のみであった〔総放射能 AUC(0-4)の 1.6%〕。投与後 4 時間以降に循環血中で認められた放射能成分はベルイシグアトのみであった（2.6.5.9-1）。

尿中放射能の大部分はベルイシグアト（投与量の 2.35%）で、その他に複数の微量代謝物が認められた。N－グルクロン酸抱合体 M-1 が糞中放射能の大部分（投与量の 50.9%）を占め、続いてベルイシグアト（投与量の 19.3%）及び水酸化体 M-3（投与量の 7.86%）が認められた（表 2.6.4.5- 2、2.6.5.9-1）。

表 2.6.4.5- 2　ビーグル犬に[14C]ベルイシグアトを単回経口投与（0.6mg/kg）したときの排泄物中のベルイシグアト及び代謝物の割合〔投与量に対する割合（%）〕

Matrix	Urine	Feces
Sampling interval	**0-168 h**	
Components	**(% of dose)**	
mass balance	(4.41)	(89.2)
vericiguat	2.35	19.3
M-1	0.401	50.9
M-2	0.209	-
M-3	0.0544	7.86
M-12	0.0712	-

Numbers represent percentage relative to the administered dose (arithmetic mean).
- = not detected.
[2.6.5.9-1] [2.6.5.13-1]

2.6.4.5.1.4　ヒト

参照項目：4.2.2.4.4 PH-38512

6 例の健康被験者に[14C]ベルイシグアトを経口投与（5mg）したとき、血漿中の主要代謝物は M-1（ベルイシグアトのグルクロン酸抱合体）で、総放射能 AUC の 72%を占めたが、ベルイシグアトは総放射能 AUC の約 27%であった（2.6.5.9-1）。M-1 には sGC に対する薬理活性はなく、オフターゲット作用も有していない（2.6.2.2.1.3、2.6.2.3.1）。

ヒトに[14C]ベルイシグアトを経口投与したとき、投与放射能の 53.1%が尿中に、45.2%が糞中に排泄された。尿中放射能の大部分は代謝物 M-1（投与量の 40.8%）で、続いてベルイシグアト（投与量の 9.0%）が多く認められた。代謝物 M-15 が、尿中及び糞中の微量代謝物として認められた（それぞれ投与量の 1.9%及び 1.6%）。糞中の放射能の大部分はベルイシグアト（投与量の 42.6%）であった（表 2.6.4.5- 3、2.6.5.9-1）。ヒトにベルイシグアトを経口投与したときと静脈内投与したときの血漿中薬物動態を比較した結果に基づくと（2.7.2.3.1.1、5.3.1.1.1 PH-39515）、経口バイオアベイラビリティは高く（93%）、ヒトにおいてベルイシグアトは完全に吸収されると考えられる。ヒトの糞中において、代謝物 M-1 は認められなかった。M-1 をヒトの糞と嫌気性条件下でインキュベーションした *ex vivo* 試験において、M-1 は腸内細菌叢により加水分解され、ベルイシグアトが生成された。したがって、糞中に認められた未変化体は、未変化体の胆汁中排泄／消化管分泌、並びに腸管内での M-1 の加水分解に由来すると考えられる。グルクロン酸抱合は、ヒトにおける総クリアランスの少なくとも 41%は寄与している可能性がある。

表 2.6.4.5- 3　ヒトに[14C]ベルイシグアトを単回経口投与（5mg）したときの排泄物中のベルイシグアト及び代謝物の割合〔投与量に対する割合（%）〕

Matrix	Urine	Feces
Sampling interval	**0-336 h**	
Components	**(% of dose)**	
mass balance	(53.1)	(45.2)
vericiguat	9.00	42.6
M-1	40.8	-
M-15	1.91	1.61

Numbers represent percentage relative to the administered dose (arithmetic mean; N=6).
- = not detected.
[2.6.5.9-1] [2.6.5.13-2]

以上を総合すると、ラット、イヌ及びヒトにおいて、未変化体ベルイシグアトのグルクロン酸抱合及び直接排泄、並びに酸化的代謝（イヌ及びヒトでは副次的な経路）が、ベルイシグアトのクリアランスに寄与していた。

2.6.4.5.2　*In Vitro* 代謝

非臨床動物種及びヒトの肝ミクロソーム及び肝細胞を用いて、ベルイシグアトの *in vitro* 代謝試験を実施した。

2.6.4.5.2.1　種間比較

参照項目：4.2.2.4.5 PH-39055

[^{14}C]ベルイシグアト（5μM）を、NADPH 存在下で非臨床動物種及びヒト（プール）の肝ミクロソームとインキュベーションし、酸化的代謝を評価した。全般的に、代謝割合は低かった。すべての動物種でみられた主要な代謝経路は、アミノ基に隣接するメチルカルバミン酸部分の異性化であった（M-9 を生成する）。しかし、この異性化代謝物は肝細胞とのインキュベーションや *in vivo* ではみられなかったことから、この反応は肝ミクロソームに特異的であると考えられる。また、M-2 を生成する N－脱アルキル化、並びに M-3、M-4 及び M-5 を生成するフルオロベンジル基の一水酸化がみられた。ヒト特異的な代謝物はみられなかった（表 2.6.4.5- 4、2.6.5.10-1）。

表 2.6.4.5- 4　[^{14}C]ベルイシグアトを肝ミクロソームとインキュベーション（NADPH 存在下）したときの代謝物プロファイル〔総放射能に対する割合（%）〕

Analyte	CD-1 Mouse (male)	NMRI Mouse (male)	Wistar Rat (male)	Wistar Rat (female)	Himalaya Rabbit (female)	Beagle Dog (female)	Cynomolgus Monkey (male, female)	Human (pool)
M-2	Trace[a]	Trace[a]	1.5	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]
M-3	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	0.6	Trace[a]
M-4	Trace[a]	Trace[a]	-	-	Trace[a]	Trace[a]	1.6	0.4
M-5	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]
M-8	Trace[a]	Trace[a]	-	-	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]
M-9	10.9	7.4	3.6	Trace[a]	16.2	3.4	7.9	4.1
vericiguat	89.1	92.6	94.9	100	83.8	96.6	90.0	95.5

- = not detected.
[a] <Limit of detection by means of HPLC-LSC, detected by LC-MS/MS.
[2.6.5.10-1]

[^{14}C]ベルイシグアト（2.5μM）を、ラット、イヌ及びヒトの新鮮肝細胞懸濁液中で、4 時間インキュベーション（37℃）した。ヒト肝細胞での代謝割合は非常に低かった。ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合（M-1 を生成）が、検討したすべての動物種における主要な代謝経路であった。N－脱アルキル化による M-2 の生成が、検討したすべての動物種で副次的経路としてみられた。更に、水酸化（M-3 及び M-5 を生成）とそれに続くグルクロン酸抱合（M-10 及び M-11 を生成）、水酸化とそれに続く硫酸抱合（M-12 を生成）、及び水酸化とそれに続くグルタチオン抱合（M-16、M-17 及び M-18 を生成）が、ラット肝細胞とのインキュベーションにおいて最も顕著にみられたが、イヌ肝細胞ではそれほど顕著ではなく、ヒト肝細胞ではほとんどみられなかった。ラット及びヒト肝細胞では、代謝物 M-15（おそらく最初に脱メチル化され、その後脱炭酸とそれに続くアセチル化によって生成される）が微量代謝物としてみられた（表 2.6.4.5-5、2.6.5.10-1）。

表 2.6.4.5- 5　[^{14}C]ベルイシグアトを肝細胞とインキュベーションしたときの代謝物プロファイル〔総放射能に対する割合（%）〕

Analyte	Wistar Rat (Average, N = 2)	Beagle Dog (Average, N = 2)	Human (Average, N = 2)
M-1	6.2	12.2	1.2
M-2	0.9	Trace[a]	0.3
M-3	1.6	Trace[a]	Trace[a]
M-5	Trace[a]	-	-
M-10	3.6	1.2	-
M-11	1.3	-	-
M-12	1.6	Trace[a]	-
M-15	0.4	-	Trace[a]
M-16	4.5	Trace[a]	-
M-17	0.9	Trace[a]	-
M-18	0.4	Trace[a]	-
vericiguat	76.9	85.3	98.3

- = not detected.
[a] <Limit of detection by means of HPLC-LSC, detected by LC-MS/MS.
[2.6.5.10-1]

[^{14}C]ベルイシグアトの *in vitro* 代謝において、ヒト特異的な代謝物はみられなかった。

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 ラット

参照項目：4.2.2.5.1 A50438

無処置ラット（n＝5）に[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与（3mg/kg）、並びにBDCラット（n＝3）に[^{14}C]ベルイシグアトを静脈内投与（1mg/kg）及び経口投与（3mg/kg）し、ベルイシグアトの*in vivo*排泄を検討した（表2.6.4.6- 1、2.6.5.13-1）。

表2.6.4.6- 1 ラット（無処置、BDCラット）に[^{14}C]ベルイシグアトを単回投与（経口：3mg/kg、静脈内1mg/kg）したときの放射能の排泄量〔投与量に対する割合（%）〕

Route	Duration (h)	Urine (%) (% CV)	Bile (%) (% CV)	Feces (%) (% CV)	GIT (%) (% CV)	Residues[a] (%) (% CV)	Recovery (%) (% CV)
PO	0-168	11.4 (16.7)	n.a.	81.2 (3.76)	0.002 (31.4)	0.024 (85.2)	92.7 (3.05)
IV (BDC)	0-24	14.8 (47.8)	43.3 (2.68)	30.0 (19.2)	2.62 (36.9)	2.27 (27.7)	94.0 (3.93)
PO (BDC)	0-24	9.88 (17.2)	34.7 (21.0)	36.4 (20.8)	8.98 (51.6)	3.78 (9.70)	95.6 (0.716)

GIT = Gastrointestinal tract.
[a] Residual radioactivity in carcass excluding gastrointestinal tract.
n.a. = not applicable.
[2.6.5.13-1]

無処置ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、放射能は主に胆汁／糞経路を介して排泄され（投与量の 81.2%）、尿中への排泄は少量（投与量の 11.4%）であった。血漿中の消失半減期が短い（2～3 時間、2.6.4.3.1.1）ことから予想されたように、放射能は速やかに排泄され、投与後 24 時間までに投与量の 85%超が排泄された。投与後 168 時間の体内の残存放射能は極めて少量であった（投与量の＜0.1%）。

BDC ラットでは、投与量の約 35%（経口）及び 43%（静脈内）が胆汁中に排泄された。静脈内投与したとき、相当量の放射能が糞中（投与量の 30%）及び消化管（投与量の 2.6%）から回収され、その大部分が未変化体であったことから、ラットにおいて消化管分泌はベルイシグアトの主要な消失経路であることが示唆された。

2.6.4.6.2 イヌ

参照項目：4.2.2.2.3 PH-38159

無処置のイヌ（n＝4）に[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与（0.6mg/kg）し、*in vivo* 排泄を検討した（表2.6.4.6- 2、2.6.5.13-1）。

表2.6.4.6- 2 イヌに[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与（0.6mg/kg）したときの放射能の排泄量〔投与量に対する割合（%）〕

Route	Duration (h)	Urine (%) (% CV)	Feces (%) (% CV)	Cage Wash (%) (% CV)	Recovery (%) (% CV)
PO	0-168	4.41 (23.3)	89.2 (3.16)	0.5 (19.1)	94.1 (3.77)

[2.6.5.13-1]

[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与したとき、放射能は主に胆汁／糞経路を介して排泄され（投与量の 89.2%）、尿中への排泄はわずか（投与量の 4.4%）であった。放射能はほぼ完全に回収された（94.1%）。

2.6.4.6.3 ヒト

参照項目：5.3.3.1.5 PH-38476

第 I 相臨床試験において、健康男性被験者（6 例）に[^{14}C]ベルイシグアトを 5mg（3.7MBq）の用量で単回経口投与し、血漿中薬物動態、代謝及び排泄（マスバランス）を検討した。排泄の結果を表 2.6.4.6- 3 及び 2.6.5.13-2 に示す。

表 2.6.4.6- 3 ヒトに[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与（5mg）したときの放射能の排泄量〔投与量に対する割合（%）〕

Route	Duration (Days)	Urine (%) (% CV)	Feces (%) (% CV)	Recovery (%) (% CV)
PO	0-14	53.1 (5.01)	45.2 (7.58)	98.3 (1.53)

Single oral dose of [^{14}C]vericiguat (5 mg) was administered to six healthy subjects.
[2.6.5.13-2]

投与後 14 日までに、放射能の排泄量は、平均で 98.3%（範囲：95.6%～99.8%）に達した。放射能の尿中への排泄量は投与量の 53.1%（範囲：49.9%～56.1%）で、糞中への排泄量は投与量の 45.2%（範囲：40.1%～49.9%）であった。投与放射能の大部分（約 94%）が投与後 7 日までに回収された。

2.6.4.6.4 ラットの乳汁排泄

参照項目：4.2.2.5.2 PH-40400

授乳ラット（出産後 8 日）に[^{14}C]ベルイシグアト（1mg/kg）を単回静脈内投与し、ベルイシグアトの乳汁排泄を検討した。投与後、母動物にはそれぞれの同腹仔に試料採取時点（投与後 8 及び 24 時間）まで授乳させた。各母動物の同腹仔に含まれる合計の放射能量を、放射能の乳汁排泄（分泌）のサロゲートとして測定した。投与後から試料採取時点（投与後 0～8 時間及び 0～24 時間）までに乳汁中に排泄された推定放射能量は、投与量の約 12%であった（2.6.5.7-4）。

2.6.4.7　　薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1　　ベルイシグアトの消失に関わる薬物代謝酵素

2.6.4.7.1.1　ベルイシグアトの酸化的代謝に関わる CYP 分子種の同定

参照項目：4.2.2.6.2 PH-39129

ヒトにおいて、酸化的代謝はベルイシグアトの副次的な消失経路である（投与量の＜4%）（2.6.4.5.1.4）が、[^{14}C]ベルイシグアトを 21 種のヒト CYP 分子種発現系とインキュベーションし、ベルイシグアトの代謝に関わる CYP 分子種の同定試験を実施した。5 種の分子種（CYP1A1、CYP1A2、CYP2J2、CYP3A4 及び CYP3A5）が、複数の代謝物を生成する分子種として同定された。これらの代謝物は、NADPH 存在下のヒト肝ミクロソームで生成されたものと一致した（2.6.5.15-6）。ヒト肝ミクロソームにおける代謝割合は非常に低かったため、CYP の選択的阻害薬を用いたヒト肝ミクロソームによる CYP 分子種同定試験は実施しなかった。

総クリアランスに対する酸化的代謝の寄与はわずかであることを考慮すると、CYP 阻害薬によってベルイシグアトの薬物動態は影響を受けないと考えられる。これに合致して、臨床薬物相互作用試験において、ケトコナゾール（CYP3A 阻害薬）のベルイシグアトの薬物動態に対する影響はわずかであった（AUC は 13%の増加であった）（2.7.2.2.4.1.2.1）。

2.6.4.7.1.2　ベルイシグアトのグルクロン酸抱合に関わる UGT 分子種の同定

参照項目：　4.2.2.6.1 PH-38399
4.2.2.6.24 PH-41293

ヒトにおいて、ベルイシグアトのグルクロン酸抱合は、主要な代謝経路である。ベルイシグアトのグルクロン酸抱合に関わる UGT 分子種の同定試験において、グルクロン酸抱合は複数の UGT 分子種（UGT1A1、1A3、1A4、1A7、1A8 及び 1A9）によって触媒された。UGT1A1 及び UGT1A9 発現系とのインキュベーションにおいて、最も顕著な M-1 生成がみられた（2.6.5.15-1）。ウリジン 5'－二リン酸グルクロン酸（UDPGA）存在下のヒト肝、腎及び腸ミクロソームにおいて、ベルイシグアトのグルクロン酸抱合が触媒された（2.6.5.15-2）。腎臓における UGT1A1 発現量は非常に低いことから[1)]、ヒト腎ミクロソームにおけるグルクロン酸抱合は UGT1A9 を介している可能性が高い。単一ドナー由来のヒト肝ミクロソーム（n＝20）を用いた試験において、M-1 の生成は、高選択性の UGT1A9 を介した経路であるプロポフォールのグルクロン酸抱合の程度と良い相関を示し（r^2＝0.73）、続いて、高選択性の UGT1A1 を介した経路であるエストラジオールのグルクロン酸抱合の程度とも良い相関を示した（r^2＝0.61）ことから、ベルイシグアトの代謝におけるこの 2 つの UGT 分子種の関与が裏付けられた（2.6.5.15-4）。酵素反応速度論解析において、ベルイシグアトの UGT1A9 に対するミカエリス-メンテン定数（K_m）は 1.8μM、UGT1A1 に対する K_mは 11.5μM であった。*In vitro* の酵素反応速度論解析及び relative activity factor（RAF）法による解析に基づくと、肝臓におけるベルイシグアトのグルクロン酸抱合に対する UGT 分子種の寄与率は、UGT1A1 が約 40%、UGT1A9 が約 60%であると推定された（2.6.5.15-5）。これは、阻害薬を用いた *in vitro* 試験の結果と合致し、ヒト肝ミクロソームにおいて、UGT1A9 阻害薬ニフルム酸によるベルイシグアトのグルクロン酸抱合の阻害（5μM で 50%～60%の阻害）は、強力な UGT1A1 阻害薬アタザナビル（5μM で 25%～45%の阻害）よりもわずかに強かった（2.6.5.15-3）。UGT1A9 は腎臓における発現が高いことを考慮すると、UGT1A9 は、肝臓だけでなく、腎臓においても M-1 生成に寄与していると考えられる。

2.6.4.7.1.3　UGT 阻害薬がベルイシグアトのグルクロン酸抱合に与える影響

参照項目：4.2.2.6.3 PH-38190

ベルイシグアトが被相互作用薬となる可能性を検討するために、複数の既知の UGT 阻害薬（アタザナビル、ダサチニブ、ジフルニサル、プロベネシド、ニフルム酸及びメフェナム酸）が、ベルイシグアトのグルクロン酸抱合を阻害する可能性を *in vitro* で評価した（2.6.5.15-7）。UGT1A9 阻害薬であるメフェナム酸及びニフルム酸は、ベルイシグアトのグルクロン酸抱合を阻害し、IC_{50} はそれぞれ 26.1μM 及び 4.7μM であった。メフェナム酸及びニフルム酸の IC_{50} と臨床における非結合型 C_{max} に基づくと、メフェナム酸及びニフルム酸は、グルクロン酸抱合を阻害することにより、ヒトにおいてベルイシグアトの曝露量を増加させる可能性がある。しかし、メフェナム酸を用いた臨床薬物相互作用試験において、ベルイシグアトの AUC 増加はわずかであった〔AUC 変化率（AUCR）＝1.2〕ことから、UGT1A9 阻害薬の併用は、ベルイシグアトの薬物動態に対して臨床的に意味のある影響を与えないことが示唆された（2.7.2.2.4.1.2.2）。このことは、ベルイシグアトが、複数の UGT 分子種（UGT1A9、UGT1A1）による代謝を含む、複数のクリアランス経路を介して消失することからも支持される（2.6.4.5.1.4）。アタザナビル（UGT1A1 阻害薬）及びプロベネシド（非選択的 UGT 阻害薬）は、ヒト肝ミクロソームにおいてベルイシグアトのグルクロン酸抱合を阻害せず、IC_{50} はそれぞれ 100μM 超及び 2000μM 超であったことから、アタザナビル及びプロベネシドは、臨床においてベルイシグアトの薬物動態に影響を与えないと考えられる。

2.6.4.7.2　薬物代謝酵素の阻害

参照項目：4.2.2.6.4 PH-38684
4.2.2.6.6 PH-40742
4.2.2.6.5 PH-38683
4.2.2.6.7 A57470
4.2.2.6.8 PH-38890

ベルイシグアト及び M-1 は、ヒト CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、2J2 及び 3A4 に対して可逆的阻害作用を示さなかった（IC_{50} ＞50μM）。CYP1A1 に対しては可逆的阻害作用を示し、ベルイシグアトの IC_{50} は 2.9μM、M-1 の IC_{50} は 9.9μM であった。また、ヒト肝ミクロソームにおいてプレインキュベーション（30 分間）をした場合にも、ベルイシグアト及び M-1 の CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4 に対する阻害作用は増加しなかった（表 2.6.4.7- 1、2.6.5.15-8、2.6.5.15-9）。

表 2.6.4.7- 1 ベルイシグアト及び M-1 のヒト CYP 分子種に対する阻害作用

Isoform	Probe substrate	Vericiguat		M-1	
		IC_{50} (μM) Coinc.[a]	IC_{50} (μM) 30 min preinc.[b]	IC_{50} (μM) Coinc.[a]	IC_{50} (μM) 30 min preinc.[b]
CYP1A1	Granisetron	2.9	n.d.	9.9	n.d.
CYP1A2	Phenacetin	> 50	> 50	> 100	> 50
CYP2A6	Coumarin	> 50	n.d.	> 100	n.d.
CYP2B6	Bupropion	> 50	> 50	> 100	> 50
CYP2C8	Amodiaquine	> 50	> 50	> 100	> 50
CYP2C9	Diclofenac	> 50	> 50	> 100	> 50
CYP2C19	S-mephenytoin	> 50	> 50	87	> 50
CYP2D6	Dextromethorphan	> 50	> 50	> 100	> 50
CYP2E1	Chlorzoxazone	> 50	n.d.	> 100	n.d.
CYP2J2	Ebastine	> 50	n.d.	> 100	n.d.
CYP3A4	Midazolam	> 50	> 50	> 100	> 100
CYP3A4	Testosterone	> 50	> 50	> 100	> 100

n.d. = not determined.
[a] Coincubation.
[b] Preincubation.
[2.6.5.15-8] [2.6.5.15-9]

ベルイシグアトは、ヒト UGT1A1、1A4、1A6、2B4 及び 2B7 に対して阻害作用を示さなかった（IC_{50} ＞50μM）が、UGT1A9 に対しては阻害作用を示し、K_i は 6.6μM であった。M-1 は、検討したすべての UGT 分子種（UGT1A1、1A4、1A6、1A9、2B4 及び 2B7）に対して阻害作用を示さなかった（IC_{50} ＞50μM）（表 2.6.4.7- 2、2.6.5.15-10、2.6.5.15-11）。

表 2.6.4.7- 2 ベルイシグアト及び M-1 のヒト UGT 分子種に対する阻害作用

Isoform	Probe substrate	Vericiguat IC_{50} (μM)	M-1 IC_{50} (μM)
UGT1A1	Estradiol (estradiol 3-glucuronide)	>50	>50
UGT1A4	Trifluoperazine	>50	>50
UGT1A4	1'-Hydroxymidazolam (1'-hydroxymidazolam *N*-glucuronide)	>50	>50
UGT1A6	α-Naphthol	>50	>50
UGT1A9	Propofol	10.6 (K_i 6.6)	>50
UGT2B4	1'-Hydroxymidazolam (1'-hydroxymidazolam *O*-glucuronide)	>50	>50
UGT2B7	3'-Azido-3'-deoxythymidine[a]	>50	>50

[a] Tarenflurbil was used as the probe substrate, when M-1 was assessed for inhibition potential.
[2.6.5.15-10] [2.6.5.15-11]

ヒトにベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したときのベルイシグアトの曝露量［総 C_{max}：0.8μM（＝350μg/L、2.7.2.3.1.6）、非結合型 C_{max}：0.02μM、肝臓入り口血液中の推定非結合型最高濃度：0.03μM〔臨床データから得られた吸収速度定数（k_a）0.0212min^{-1} を用いて算出〕］、及び代謝物 M-1 の曝露量〔総 C_{max}：2.7μM（＝1,610μg/L、2.7.2.3.1.3.1）、非結合型 C_{max}：0.04μM〕を用いて、カットオフ基準による評価〔1 + $C_{max,u}/K_{i,u}$（又は $C_{max,u}/K_{i,u}$）：$C_{max,u}$＝非結合型 C_{max}、$K_{i,u}$＝非結合型 K_i〕、又は静的薬物速度論（MSPK）モデルによる評価において基準値を下回ったことから、ベルイシグアト及び M-1 が酵素阻害によって臨床薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられる（2.6.5.15-12、2.6.5.15-13、2.6.5.15-14、2.6.5.15-15）。k_a の理論的最高値（0.1min^{-1}）を用いてベルイシグアトの肝臓入り口血液中の推定非結合型最高濃度を算出（0.066μM）した場合においても、MSPK モデルによる AUCR は 1.25 未満であった。更に、CYP3A4 の典型基質（ミダゾラム）及び CYP2C9 の典型基質（ワルファリン）を用いた臨床薬物相互作用試験において、臨床的に意味のある薬物相互作用はみられなかった（2.7.2.2.4.2.1、2.7.2.2.4.3.2）。

2.6.4.7.3 チトクローム P450（CYP）酵素の誘導

参照項目：4.2.2.6.9 PH-39549

3 例のドナー由来の初代培養ヒト肝細胞（凍結肝細胞）を用いて、ベルイシグアト及び M-1 の CYP 誘導作用を評価した。

ベルイシグアトは、検討した最高濃度 10,000μg/L（＝23.5μM）まで、CYP1A2 及び CYP2B6 に対して顕著な誘導作用を示さなかった。CYP3A4 については、3 例中 1 例のドナーで、検討した最高濃度でのみ mRNA が 2.7 倍に増加した（陽性対照リファンピシンの 4%）。臨床における CYP3A4 の誘導による薬物相互作用の可能性を、relative induction score（RIS）法を用いて評価した。RIS 法には、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験のデータ〔mRNA に対する最大誘導作用（E_{max}）及び E_{max} の 50%の作用をもたらす濃度（EC_{50}）〕、及びヒトにベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したときのベルイシグアトの曝露量〔総 C_{max}：0.8μM（＝350μg/L、2.7.2.3.1.6）、非結合型 C_{max}：0.02μM〕を用いた。RIS 法による評価において、ミダゾラムの AUC の減少は 15%と推定されたことから、ベルイシグアトは臨床において CYP3A4 に対して誘導作用を示さないと考えられる（2.6.5.15-16）。

代謝物 M-1 は、検討した最高濃度 90,000μg/L（＝150μM）まで、CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対して誘導作用を示さなかった。ヒトにベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したときの M-1 の曝露量〔総 C_{max}：2.7μM（＝1,610μg/L、2.7.2.3.1.3.1）、非結合型 C_{max}：0.04μM〕を考慮すると、臨床において M-1 の CYP 誘導を介した薬物相互作用は起こらないと考えられる（2.6.5.15-17）。

2.6.4.7.4 ベルイシグアトの分布におけるトランスポーターの役割

2.6.4.7.4.1 Caco-2 細胞におけるベルイシグアト及び M-1 の細胞膜透過性

参照項目： 4.2.2.6.10 PH-39500
4.2.2.6.11 PH-40308

Caco-2 細胞単層膜を用いてベルイシグアト及び M-1 の *in vitro* 膜透過性を検討した。ベルイシグアト（2μM）の頂端膜（A）側から基底膜（B）側方向への見かけの膜透過係数（P_{app} A-B）は 111nm/s、B 側から A 側方向への見かけの膜透過係数（P_{app} B-A）は 464nm/s で、排出比（efflux ratio）は 4.21 であった（2.6.5.15-18）。このことはベルイシグアトが P-gp の基質であることと合致する（2.6.4.7.4.2）。対照化合物の膜透過性データとの比較から、ベルイシグアトは FDA の生物薬剤学的分類システム（BCS）に関するガイドラインにおいて、高膜透過性に分類される。

M-1（20μM）の Caco-2 細胞における膜透過性は低く、P_{app} A-B は 1.1nm/s、P_{app} B-A は 1.0nm/s で、排出比は 0.92 であった（2.6.5.15-19）。

2.6.4.7.4.2 ベルイシグアト及び M-1 の排出トランスポーターに対する基質特性

参照項目： 4.2.2.6.12 PH-39110
4.2.2.6.13 PH-39547
4.2.2.6.14 PH-39113
4.2.2.6.15 PH-39548

ベルイシグアト及び M-1 の排出トランスポーターP-gp 及び BCRP に対する基質特性を、P-gp 発現細胞及び BCRP 発現細胞を用いて検討した。特異的阻害薬の存在下及び非存在下でベルイシグ

アト及びM-1のA側からB側方向への輸送、及びB側からA側方向への輸送を検討した。また、特異的プローブ基質を陽性対照としてアッセイに含めた。

L-MDR1 細胞（P-gp 発現細胞）におけるベルイシグアト（1μM）の排出比は 6.9 で、2 を上回った。更に、P-gp 阻害薬（イベルメクチン）の存在下で排出比が 1.3 に低下したことから、ベルイシグアトが P-gp の基質であることが確認された（2.6.5.15-20）。MDCKII-BCRP 細胞（BCRP 発現細胞）におけるベルイシグアト（2μM）の排出比は 10.8 で、2 を上回った。更に、BCRP 阻害薬（Ko143）の存在下で排出比が 0.7 に低下したことから、ベルイシグアトは BCRP の基質であることが確認された（2.6.5.15-22）。

L-MDR1 細胞（P-gp 発現細胞）における M-1（1～50μM）の排出比は 1.4～1.9 で、非発現細胞である LLC-PK1 細胞では排出比が 0.9～1.1 であったことから、M-1 は P-gp の基質ではないと考えられる。一方、ジピリダモール（P-gp のプローブ基質）の排出比は 48 で、P-gp 阻害薬（イベルメクチン）の存在下で排出比が 2.9 に低下したことから、同アッセイにおける P-gp の機能の発現が確認された（2.6.5.15-21）。MDCKII-BCRP 細胞（BCRP 発現細胞）における M-1（1～50μM）の排出比は 1.6～2.2 で、非発現細胞である MDCKII 細胞では排出比が 2.3～3.5 であったことから、M-1 は BCRP の基質ではないと考えられる。一方、トポテカン（BCRP のプローブ基質）の排出比は 25 で、BCRP 阻害薬（Ko143）の存在下で排出比が 1.1 に低下したことから、同アッセイにおける BCRP の機能の発現が確認された（2.6.5.15-23）。

2.6.4.7.4.3　ベルイシグアト及び M-1 の取込みトランスポーターに対する基質特性

参照項目：　4.2.2.6.16 R-9572
4.2.2.6.17 R-9571
4.2.2.6.18 R-9971

ベルイシグアト及び M-1 の OATP1B1 及び OATP1B3 に対する基質特性、並びにベルイシグアトの OCT1 に対する基質特性を、各トランスポーターの発現細胞を用いて評価した。各トランスポーターに対する阻害薬の存在下及び非存在下でベルイシグアト及び M-1 の取込みを検討した。

ベルイシグアト（0.5 及び 5μM）の OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 を介した能動的取込みはみられず、ベルイシグアトは OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質ではないと考えられる。一方、estrone-3-sulfate（OATP1B1 のプローブ基質）、スルホブロモフタレイン（OATP1B3 のプローブ基質）及び 1-methyl-4-phenylpyridinium（OCT1 のプローブ基質）の取込みは認められ、取込み比はそれぞれ、43、4 及び 11 であった。OATP1B1/3 阻害薬（リファンピシン）及び OCT1 阻害薬（デシニウム 22）の存在下で取込み比はそれぞれ 9.5、1.3 及び 3.9 に低下したことから、同アッセイにおける OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の機能の発現が確認された（2.6.5.15-24）。

代謝物 M-1（0.2 及び 2μM）の OATP1B1 及び OATP1B3 を介した能動的取込みはみられず、M-1 は OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではないと考えられる。一方、estrone-3-sulfate（OATP1B1 のプローブ基質）及びスルホブロモフタレイン（OATP1B3 のプローブ基質）の取込みは認められ、取込み比はそれぞれ 26 及び 2.6 であった。OATP1B1/3 阻害薬（リファンピシン）の存在下で取込み比はそれぞれ 6.9 及び 1.1 に低下したことから、同アッセイにおける OATP1B1 及び OATP1B3 の機能の発現が確認された（2.6.5.15-25）。

2.6.4.7.5　　トランスポーターの阻害

2.6.4.7.5.1　ベルイシグアト及び M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用

参照項目：　4.2.2.6.12 PH-39110
4.2.2.6.13 PH-39547
4.2.2.6.14 PH-39113
4.2.2.6.15 PH-39548
4.2.2.6.22 R-11193
4.2.2.6.23 R-11114

ベルイシグアト及び M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用を、各トランスポーターの発現細胞において、特異的プローブ基質を用いて評価した（表 2.6.4.7- 3、2.6.5.15-26、2.6.5.15-29）。

表 2.6.4.7- 3　ベルイシグアト及び M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用

Transporter	Probe substrate	Vericiguat IC_{50} (μM)	M-1 IC_{50} (μM)
P-gp	Digoxin	>100	>200
P-gp	Dipyridamole	>100	>200
BCRP	Topotecan	26	>200
BCRP	Fluvastatin	20	n.d.
MATE1	Metformin	>10	>10
MATE2-K	Metformin	>10	>10
BSEP	Taurocholic acid	>100	>100

n.d. = not determined.
[2.6.5.15-26] [2.6.5.15-29]

ベルイシグアト及び M-1 は、検討した最高濃度まで、P-gp（ベルイシグアト：100μM まで、M-1：200μM まで）、MATE1（10μM まで）、MATE2-K（10μM まで）及び BSEP（100μM まで）に対して阻害作用を示さなかった。更に、ジゴキシン（P-gp のプローブ基質）を用いた臨床薬物相互作用試験において、ベルイシグアトはジゴキシンの薬物動態に影響を与えなかった（2.7.2.2.4.5.2）。

ベルイシグアトは BCRP に対して阻害作用を示し、IC_{50} は 26μM（基質：トポテカン）及び 20μM（基質：フルバスタチン）であった。ヒトにベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したときのベルイシグアトの非結合型 C_{max}（$C_{max,u}$：0.02μM）及び推定消化管内最高濃度（I_{gut}：10mg/250mL＝94μM）を用いると、I_{gut}/K_i は 4.7、$C_{max,u}/K_i$ は 0.001 と算出された（プローブ基質の濃度がそれぞれの K_m に対して十分に低いことから K_i＝IC_{50} とした）。これらの値はすべて、臨床薬物相互作用試験を考慮するべきカットオフ基準値〔I_{gut}/K_i≧10（又は $C_{max,u}/K_i$≧0.02）〕より低かった。したがって、BCRP 基質と併用したときにベルイシグアトが臨床的に意味のある薬物相互作用を起こす可能性は非常に低い（2.6.5.15-27、2.6.5.15-28）。

以上を総合すると、ベルイシグアト及び M-1 は、検討した排出トランスポーターに対する阻害を介して、それらの基質と臨床的に意味のある薬物相互作用を起こさないと考えられる（2.6.5.15-27、2.6.5.15-28、2.6.5.15-30、2.6.5.15-31）。

2.6.4.7.5.2 ベルイシグアト及び M-1 の取込みトランスポーターに対する阻害作用

参照項目： 4.2.2.6.19 PH-40670
4.2.2.6.20 R-9867
4.2.2.6.21 R-9698

ベルイシグアト及び M-1 の取込みトランスポーターに対する阻害作用を、各トランスポーターの発現細胞において、特異的プローブ基質を用いて検討した（表 2.6.4.7- 4、2.6.5.15-26、2.6.5.15-29）。アッセイで用いたプローブ基質の濃度は、それぞれの K_m より十分に低く、競合阻害を仮定し、K_i は IC_{50} に等しいとした。

表 2.6.4.7- 4 ベルイシグアト及び M-1 の取込みトランスポーターに対する阻害作用

Transporter	Probe substrate	Vericiguat IC_{50} [μM]	M-1 IC_{50} [μM]
OATP1B1	Pravastatin	~16	25.6
OATP1B3	Pravastatin	~30	16.6
OAT1	Aminohippuric acid	> 5	> 5
OAT3	Estrone-3-sulfate	> 5	> 5
OCT1	MPP	> 50	> 50
OCT2	MPP	> 5	> 5

MPP = 1-methyl-4-phenylpyridinium.
[2.6.5.15-26] [2.6.5.15-29]

ベルイシグアト及び M-1 は、検討した濃度まで（OCT1 は 50μM まで、OAT1、OAT3 及び OCT2 は 5μM まで）、OAT1、OAT3、OCT1 及び OCT2 に対して阻害作用を示さなかった。ヒトにベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したときのベルイシグアトの $C_{max,u}$（0.02μM）及び M-1 の $C_{max,u}$（0.04μM）を用いて算出した $C_{max,u}/K_i$ は 0.02 未満であった（OAT1、OAT3、OCT1、OCT2）。ベルイシグアトは、肝臓の取込みトランスポーターである OATP1B1 及び OATP1B3 に対して阻害作用を示し、IC_{50} はそれぞれ約 16μM 及び約 30μM であった。M-1 の OATP1B1 及び OATP1B3 に対する IC_{50} はそれぞれ 25.6μM 及び 16.6μM であった。OATP1B1 阻害について、ヒトにベルイシグアト 10mg を 1 日 1 回反復投与したときのベルイシグアトの肝臓入り口血液中の推定非結合型最高濃度（$I_{in,max,u}$：0.03μM、臨床データから得られた k_a＝0.0212min^{-1} を用いて算出）及び M-1 の $C_{max,u}$（0.04μM）を用いて算出した $I_{in,max,u}/K_i$（ベルイシグアト）は 0.0018、$C_{max,u}/K_i$（M-1）は 0.0017 であった。k_a の理論的最高値（0.1min^{-1}）を用いてベルイシグアトの $I_{in,max,u}$ を算出した場合（$I_{in,max,u}$＝0.068μM）においても、$I_{in,max,u}/K_i$（ベルイシグアト）は 0.0041 であった。これらの値はすべて、臨床薬物相互作用試験を考慮するべきカットオフ基準値〔$I_{in,max,u}/K_i \geqq 0.1$（又は $I_{in,max,u}/K_i \geqq 0.04$）〕より十分低かった（2.6.5.15-27、2.6.5.15-28、2.6.5.15-30、2.6.5.15-31）。したがって、OATP1B1 基質と臨床的に意味のある薬物相互作用を起こす可能性は低い。同様に、ベルイシグアト及び M-1 の OATP1B3 に対する IC_{50} は OATP1B1 に対する IC_{50} と同程度であることから、ベルイシグアト及び M-1 が OATP1B3 阻害を介した薬物相互作用を起こす可能性も低い。

以上を総合すると、ベルイシグアト及び M-1 は、検討した取込みトランスポーターの阻害を介して、それらの基質と臨床的に意味のある薬物相互作用を起こさないと考えられる。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない。

2.6.4.9 考察及び結論

ラット及びイヌにおいて、ベルイシグアトの血漿及び血液クリアランスは低く、分布容積は中程度（約 0.8～1.1L/kg）、消失半減期は 3～5 時間であった。ラット及びイヌにベルイシグアトを経口投与したとき、吸収は速やかで、t_{max} は 0.5～3 時間の範囲であった。ベルイシグアトの経口バイオアベイラビリティは、ラットで中程度（約 40％～50％）、イヌでは高かった（約 70％）。ヒトにおけるベルイシグアトの経口バイオアベイラビリティは高い（約 93％）（2.7.2.3.1.1）。

ベルイシグアト及び代謝物 M-1 の血漿タンパク結合は動物種依存的で、血漿中非結合型分率は、ベルイシグアトが 2.2%（ヒト）～10.2%（イヌ）の範囲、M-1 が 1.6%（ヒト）～15.2%（イヌ及びマウス）の範囲であった。ベルイシグアトは、主にヒト血清アルブミンと結合した。ベルイシグアトは、ラット、イヌ及びヒトにおいて、赤血球よりも血漿中に選択的に分布した。

ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与（3mg/kg）した臓器・組織分布試験において、放射能曝露量が最も高かったのは副腎皮質、腎皮質、腎髄質、腎髄質外側部、肝臓及びハーダー腺であった。血液脳関門通過性は非常に低かった。有色ラットにおいて、メラニン含有組織の放射能濃度が高かったことから、放射能のメラニン親和性が示唆された。しかし、有色ラットの 13 週間反復投与毒性試験において、メラニン結合に起因する毒性はみられなかった。妊娠ラットに[^{14}C]ベルイシグアトを投与したとき、放射能は血液胎盤関門を通過した。

マウス、ラット及びイヌに[^{14}C]ベルイシグアトを単回経口投与したとき、血漿中放射能の大部分はベルイシグアトで、微量代謝物として M-1 が認められた。一方、ヒト血漿中では、M-1 が主要な代謝物として認められ、総放射能 AUC の 72%を占めたのに対し、ベルイシグアトは 27%であった。M-1（ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合体）には sGC に対する薬理活性はなく、オフターゲット作用も有していない（2.6.2.2.1.3、2.6.2.3.1）。*In vitro* 及び *in vivo* の検討において、M-1 の化学的転位反応を示唆する結果は得られていない。したがって、医薬品規制調和国際会議（ICH）M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に基づくと、M-1 に毒性的懸念はない。しかし、がん原性試験では血漿中 M-1 濃度を測定し、ヒトにおける M-1 の曝露量は、がん原性試験の動物における曝露量により適切に担保されていた（2.6.6.5）。

ラット及びイヌに[^{14}C]ベルイシグアトを経口投与したとき、放射能は主に糞／胆汁経路を介して排泄された（ラット：投与量の 81.2%、イヌ：投与量の 89.2%）。ヒトでは、糞中と尿中に同程度排泄された（尿：投与量の 53.1%、糞：投与量の 45.2%）。排泄物の分析により、ラット、イヌ及びヒトにおいて、ベルイシグアトの総クリアランスには、グルクロン酸抱合、未変化体の排泄及び酸化的代謝（イヌ及びヒトでは寄与は小さい）が寄与することが示された。更に、BDC ラットに静脈内投与したときの糞試料の分析により、ベルイシグアトの消化管分泌が示唆された（投与量の 30%が糞中で回収された）。*In vivo* データと合致して、ラット、イヌ及びヒトの肝細胞を用いた *in vitro* 試験において、ベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合（M-1 を生成）が主要な代謝経路であった。一方、N－脱アルキル体及び複数の水酸化代謝物を生成する酸化的代謝は、ラットにおいて最も顕著で、イヌではそれほど顕著ではなく、ヒト肝細胞ではほとんど認められなかった。

In vitro の検討において、ヒトにおけるグルクロン酸抱合は主に UGT1A9 及び UGT1A1 によって触媒され、副次的な代謝経路である酸化的代謝は、主に CYP1A1、CYP1A2、CYP2J2、CYP3A4 及び CYP3A5 によって触媒されることが示唆された。*In vitro* 試験の結果から、ベルイシグアトは高膜透過性で、P-gp 及び BCRP の基質である。ベルイシグアトは取込みトランスポーター OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質ではない。代謝物 M-1 は、排出トランスポーター（P-gp、

BCRP）及び取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3）の基質ではない。ヒトにおける高い経口バイオアベイラビリティ（93%）（2.7.2.3.1.1）を考慮すると、ベルイシグアトは、P-gp 及び BCRP の阻害薬と併用したとき、吸収過程の薬物相互作用に関して、被相互作用薬とならないと考えられる。更に、ベルイシグアトは、肝臓及び腎臓での UGT1A1 及び UGT1A9 を介したグルクロン酸抱合、未変化体の尿中排泄、並びに未変化体の胆汁中排泄及び／又は消化管分泌を含む複数の経路によって消失する。このため、ベルイシグアトが臨床的に意味のある薬物相互作用を受ける可能性は低いと考えられる。このことは、ケトコナゾール（CYP 及びトランスポーターの阻害薬）及びメフェナム酸（UGT1A9 の阻害薬）を用いた臨床薬物相互作用試験において確認され、ベルイシグアトの曝露量の増加はわずかであった（AUCR＜1.25）（2.7.2.2.4.1.2.1、2.7.2.2.4.1.2.2）。また、リファンピシン（CYP、UGT 及びトランスポーターの誘導薬）を用いた臨床薬物相互作用試験において、ベルイシグアトの曝露に対するリファンピシンの誘導作用の影響も弱いことが示された（AUC は 29%減少）（2.7.2.2.4.1.2.3）。

臨床有効濃度（ベルイシグアト 10mg を 1 日１回反復投与したとき）において、ベルイシグアト及び M-1 は、主要な薬物代謝酵素の阻害薬及び誘導薬ではなく、主要な薬物トランスポーターの阻害薬でもない。したがって、主要な代謝酵素及びトランスポーターの基質と併用したときに、ベルイシグアトが臨床的に意味のある薬物相互作用を起こす可能性は低い。このことは、CYP3A4、CYP2C9 及び P-gp の典型基質（それぞれミダゾラム、ワルファリン、ジゴキシン）を用いた臨床薬物相互作用試験において確認された（2.7.2.2.4）。以上を総合すると、ベルイシグアトの全般的な薬物相互作用の可能性は低い。

2.6.4.10 図表

図表は本文中の適切な場所に記載した。

引用文献一覧

1) Margaillan G et al., Drug Metab Dispos 2015:43:611-619 (4.3.55)

2.6.5.1 薬物動態試験： 一覧表

2.6.5.1- 1 Pharmacokinetics Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location / Report number
Absorption after single dose				
Pharmacokinetics	Rat (Wistar Unilever)	IV, PO	BAG[a]	4.2.2.2.1 / PH-37467
Pharmacokinetics	Dog (Beagle)	IV, PO	BAG	4.2.2.2.2 / A50440
Pharmacokinetics	Dog (Beagle)	PO	BAG	4.2.2.2.3 / PH-38159
Distribution				
Single-dose tissue distribution	Rat (Wistar Unilever)	PO	BAG	4.2.2.3.1 / A50459
Single-dose tissue distribution	Rat (Long-Evans)	PO	BAG	4.2.2.3.1 / A50459 4.2.2.3.2 / PH-38309
Single-dose tissue distribution (placental transfer)	Pregnant Rat	PO	[redacted][b]	4.2.2.3.3 / R-9666
In vitro reversible binding	Mouse, Rat, Rabbit, Dog, Monkey and Human plasma, Cell culture medium, HLM, rCYP1A1, rUGT1A1/1A9	In vitro	BAG	4.2.2.3.4 / A50454 4.2.2.3.5 / PH-38631 4.2.2.3.7 / PH-41292
In vitro reversible binding (M-1)	Mouse, Rat, Rabbit, Dog, and Human plasma, Cell culture medium, HLM	In vitro	BAG	4.2.2.3.6 / PH-39106
Blood-to-plasma partitioning	Rat, Dog and Human	In vitro	BAG	4.2.2.3.4 / A50454
Metabolism				
Metabolism in vivo (plasma)	Mouse	PO	BAG	4.2.2.4.1 / PH-38984
Metabolism in vivo (plasma, urine, feces)	Rat (intact)	PO	BAG	4.2.2.4.2 / PH-39035
Metabolism in vivo (urine, bile, feces, gastrointestinal tract)	Rat (BDC)	IV, PO	BAG	4.2.2.4.2 / PH-39035
Metabolism in vivo (plasma, urine, feces)	Dog	PO	BAG	4.2.2.4.3 / PH-39087
Metabolism in vivo (plasma, urine, feces)	Human	PO	BAG	4.2.2.4.4 / PH-38512
Metabolism in microsomes and hepatocytes	Mouse, Rat, Rabbit, Dog, Monkey, Human	In vitro	BAG	4.2.2.4.5 / PH-39055
Excretion				
Excretion (urine, feces)	Rat (intact)	PO	BAG	4.2.2.5.1 / A50438
Excretion (urine, bile, feces)	Rat (BDC)	IV, PO	BAG	4.2.2.5.1 / A50438

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location / Report number
Excretion (urine, feces)	Dog	PO	BAG	4.2.2.2.3 / PH-38159
Excretion (urine, feces)	Human	PO	BAG	5.3.3.1.5 / PH-38476
Excretion (milk)	Rat	IV	BAG	4.2.2.5.2 / PH-40400
Pharmacokinetic Drug Interactions				
Evaluation of vericiguat as a substrate of human UGT	Recombinant human UGT isoforms, human liver, kidney and intestinal microsomes	In vitro	BAG	4.2.2.6.1 / PH-38399 4.2.2.6.24 / PH-41293
Evaluation of vericiguat as a substrate of human CYP isoforms	Recombinant human CYP isoforms	In vitro	BAG	4.2.2.6.2 / PH-39129
Inhibition of UGT-mediated glucuronidation of vericiguat by various drugs	Human liver microsomes	In vitro	BAG	4.2.2.6.3 / PH-38190
Reversible and time-dependent inhibition of human CYP isoforms (vericiguat and M-1)	Human liver microsomes, recombinant CYP1A1 and CYP2J2	In vitro	BAG	4.2.2.6.4 / PH-38684 4.2.2.6.5 / PH-38683 4.2.2.6.6 / PH-40742
Inhibition of human UGT (vericiguat and M-1)	Human liver microsomes	In vitro	BAG	4.2.2.6.7 / A57470 4.2.2.6.8 / PH-38890
Induction of human CYP1A2, 2B6 and 3A4 (vericiguat and M-1)	Human hepatocytes	In vitro	BAG	4.2.2.6.9 / PH-39549
Permeability across Caco-2 Cells (vericiguat and M-1)	Caco-2 cells	In vitro	BAG	4.2.2.6.10 / PH-39500 4.2.2.6.11 / PH-40308
Evaluation of human P-gp substrate characteristics (vericiguat and M-1)	LLC-MDR1 cells	In vitro	BAG	4.2.2.6.12 / PH-39110 4.2.2.6.13 / PH-39547
Evaluation of human BCRP substrate characteristics (vericiguat and M-1)	MDCKII-BCRP cells	In vitro	BAG	4.2.2.6.14 / PH-39113 4.2.2.6.15 / PH-39548

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location / Report number
Evaluation of human OATP1B1and OATP1B3 substrate characteristics (vericiguat and M-1)	HEK293-OATP1B1 cells; HEK293-OATP1B3 cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.6.16 / R-9572 4.2.2.6.17 / R-9571
Evaluation of human OCT1 substrate characteristics (vericiguat)	HEK293-OCT1 cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.6.18 / R-9971
Inhibition of human P-gp-mediated transport (vericiguat and M-1)	LLC-MDR1 cells	In vitro	BAG	4.2.2.6.12 / PH-39110 4.2.2.6.13 / PH-39547
Inhibition of human BCRP-mediated transport (vericiguat and M-1)	MDCKII-BCRP cells	In vitro	BAG	4.2.2.6.14 / PH-39113 4.2.2.6.15 / PH-39548
Inhibition of human OATP1B1- and OATP1B3-mediated transport (vericiguat and M-1)	HEK293-OATP1B1 cells; HEK293-OATP1B3 cells	In vitro	BAG	4.2.2.6.19 / PH-40670
Inhibition of human OAT1- and OAT3-mediated transport (vericiguat and M-1)	HEK293-OAT1 cells; HEK293-OAT3 cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.6.20 / R-9867
Inhibition of human OCT1- and OCT2-mediated transport (vericiguat and M-1)	HEK293-OCT1 cells; HEK293-OCT2 cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.6.21 / R-9698
Inhibition of human MATE1- and MATE2-K-mediated transport (vericiguat and M-1)	HEK293-MATE1 cells HEK293-MATE2-K cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.6.22 / R-11193
Inhibition of taurocholate biliary clearance (vericiguat and M-1)	Human hepatocytes	In vitro	[redacted][e]	4.2.2.6.23 / R-11114

[a] BAG = Bayer AG, Bayer Healthcare AG, Bayer Pharma AG, Bayer Schering Pharma, Germany.
[b] [redacted], USA.
[c] [redacted], Germany.
[d] [redacted], USA.
[e] [redacted], USA

Abbreviations: PO = per oral; IV = intravenous; HLM = human liver microsomes; rCYP1A1 = recombinant cytochrome P450 1A1; BDC = bile duct-cannulated; UGT = uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase; CYP = cytochrome P450; P-gp = P-glycoprotein; LLC-PK1 = Lewis lung carcinoma pork kidney cell line; MDR1 = multidrug resistance protein 1; BCRP = breast cancer resistance protein; MDCKII = Madin-Darby canine kidney cells; OATP1B1 = organic anion-transporting polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion-transporting polypeptide 1B3; HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K.

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

2.6.5.2- 1 Overall Summary of Non-Clinical Pharmacokinetic and Toxicokinetic Studies and Associated Analytical Methods

Test Articles: Vericiguat, M-1

Method-No., Version	Version comment	HPLC-system	MS/MS-system	Validation completion date	Applied to studies (Study No.)
MW1410V01	First Version	Agilent 1100	API 3000	14-JAN-2010 (rat)	T2081436
MW1429V01	First Version	Agilent 1100	API 3200	14-JUL-2010 (rat); 15-JUL-2010 (dog)	I5195-0; T4081401; T8081748; T9082306
MW1429V02	Validation of alternative ISTD	Agilent 1100	API 3200	14-JUL-2010 (rat); 07-DEC-2010 (dog)	I5194-9; I5266-9; T1083361
MW1429V03	Stability data added	Agilent 1100	API 3200	14-JUL-2010 (rat);07-DEC-2010 (dog)	T5083383; T100323-9; T100512-9; T100386-8
MW1429V04	Partial Validation of Mouse was added. Additional analytical system (HPLC and autosampler). Correction of typing error. Stability data were added.	Agilent 1100	API 3200	14-JUL-2010 (rat); 07-DEC-2010 (dog); 22-JAN-2014 (mouse)	T101121-6
MW1429V05	Partial Validation of Rabbit was added Stability data were added	Agilent 1100	API 3200	14-JUL-2010 (rat); 07-DEC-2010 (dog); 22-JAN-2014 (mouse); 06-FEB-2014 (rabbit)	T101194-6; T101240-8; T101409-5
MW1429V06	Stability data for mouse plasma were added	Agilent 1100	API 3200	14-JUL-2010 (rat); 07-DEC-2010 (dog); 22-JAN-2014 (mouse); 06-FEB-2014 (rabbit)	T101560-3
MW1429V07	Reference of calibration mode was added	Agilent 1100	API 3200	14-JUL-2010 (rat); 07-DEC-2010 (dog); 22-JAN-2014 (mouse); 06-FEB-2014 (rabbit)	T102133-0
MW1804V01	First Version (based on MW1429V07)	Agilent 1100	API 4000	03-MAR-2016 (mouse)	T102774-1
MW1847V01	First Version (based on MW1429V07)	Agilent 1100	API 4000	08-JUN-2016 (rat)	T102591-8; T102676-2
MW1796V01	First Version (BAY 1222707)	Agilent 1100	API 4000	16-MAR-2016 (mouse)	T102774-1
MW1916V01	First Version (BAY 1222707)	Agilent 1100	API 4000	13-JAN-2017 (rat)	T102676-2

Abbreviations: HPLC = High Performance Liquid Chromatography; ISTD= Internal Standard; MS/MS = Tandem Mass Spectrometer; No. = Number; V = Version

2.6.5.2- 2 Analytical Methods and Validation Reports

Test Articles: Vericiguat and M-1

Validation Report Number	4.2.2.1.1. PH-41139								
Bioanalytical Method Reference	MW1410	MW1429	MW1429	MW1429	MW1429	MW1804	MW1847	MW1796	MW1916
Activity	Full validation rat plasma	Full validation rat plasma	Full validation dog plasma	Validation mouse plasma	Validation rabbit plasma	Change of mass spectrometer mouse plasma	Change of mass spectrometer rat plasma	Full validation M-1 mouse plasma	Full validation M-1 rat plasma
Species	Rat	Rat	Dog	Mouse	Rabbit	Mouse	Rat	Mouse	Rat
Analyte	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	BAY 1222707 (M1)	BAY 1222707 (M1)
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Method	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Regression Model	log/log	log/log	log/log	log/log or Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$
Range of Quantitation (LLOQ-ULOQ) (µg/L)	10 - 10000	1 - 1000	1 - 1000	1 - 1000	1 - 1000	5 – 1000	5 - 1000	2 - 1000	5 - 1000
QC Nominal Concentration (µg/L)	26, 500, 8000	3, 30, 800	3, 30, 800	3, 30, 800	3, 30, 800	15, 120, 800	15, 120, 800	5, 40, 800	15, 100, 800
QC Inter-day Accuracy Range (%Bias)	-6.4 – 5.8	-12.6 - -5.4	-9.9 - -5.3	-1.2 – 3.0	-0.9 – 1.0	-6.2 - -3.1	-3.8 - -0.7	-5.2 – 2.0	-1.3 – 2.0
QC Inter-day Precision Range (%CV)	3.2 – 6.8	3.49 – 6.09	5.26 – 6.07	1.63 – 2.22	1.35 – 5.40	1.33 – 1.95	1.17 – 1.53	2.28 – 7.83	1.34 – 7.35
Matrix LTS (at ≤-15°C)	40 days	458 days	623 days	203 days	30 days	203 days	458 days	284 days	256 days
Dilution Integrity QC (Dilution Factor) (µg/L)	15000 (2), 20000 (5), 30000 (10)	8000 (10)	8000 (10)	5000 (10)	5000 (10)	20000 (25)	20000 (25)	5000 (10), 20000 (50)	5000 (10), 20000 (50)

Additional Information: Method MW1429 was also validated for the use of an alternative ISTD. Additionally, the regression model linear $1/x^2$ for all species was validated.
Abbreviations: CV = Coefficient of Variation; LC-MS/MS = Liquid chromatography - tandem mass spectrometry; LLOQ = Lower Limit of Quantitation; LTS = Long Term Stability; QC = Quality Control; µg/L = micrograms per Liter; ULOQ = Upper Limit of Quantitation.

2.6.5.3 薬物動態試験： 単回投与後の吸収

2.6.5.3- 1 Pharmacokinetics: Pharmacokinetics Following a Single Dose in Rats

Test Article: Vericiguat

Report Number: 4.2.2.2.1 PH-37467

Report Number:	4.2.2.2.1 PH-37467					
Species/Strain:	Rat/Wistar Unilever					
Number of animals/Gender:	3 per time point/M					
Feeding condition:	Fasted					
Vehicle/Formulation:	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water (v/v/v)					
Method of administration:	IV[a]	IV[a]	PO	PO	PO	PO
Dose (mg/kg):	0.3	1[b]	0.3	1	3[b]	10
Sample:	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte:	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat
Assay:	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters (Geometric Mean)						
CL_p (L/h/kg)	0.232	0.192	NA	NA	NA	NA
Vd_{ss} (L/kg)	0.789	0.795	NA	NA	NA	NA
$t_{½}$ (h)	2.45	3.09	3.43	3.45	2.57	8.36
AUC (µg·h/L)	1300	5220	606	2250	7410	52100
AUC_{norm} (kg·h/L)	4.32	5.22	2.02	2.25	2.47	5.21
C_{max} (µg/L)	NA	NA	104	305	1140	6980
$C_{max,norm}$ (kg/L)	NA	NA	0.345	0.305	0.382	0.698
T_{max} (h)	NA	NA	1.50	3.00	1.50	1.00
Bioavailability (%)[c]	NA	NA	38.8	43.1	47.3	99.9

[a] IV bolus.
[b] [^{14}C]vericiguat was administered (specific activity = 2.85 MBq/mg).
[c] Bioavailability was calculated relative to the AUC_{norm} at 1 mg/kg IV.
Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; PO = per oral; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; CL_p = plasma clearance; Vd_{ss} = volume of distribution at steady state; $t_{½}$ = terminal half-life; AUC = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; AUC_{norm} = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; $C_{max,norm}$ = C_{max} normalized to dose; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; MBq = megabecquerel.
Additional Information: Plasma was obtained by terminal bleeding (N=3 per time point). Values were calculated from the geometric mean concentration vs time profile. As such, standard deviation could not be calculated.

2.6.5.3- 2 Pharmacokinetics: Pharmacokinetics Following Single Dose in Dogs

Test Article: Vericiguat
Report Numbers: 4.2.2.2.2 A50440, 4.2.2.2.3 PH-38159

Report Number:	4.2.2.2.2 A50440			4.2.2.2.3 PH-38159
Species/Strain:	Dog/Beagle			Dog/Beagle
Number of animals/Gender:	3/F			4/F
Feeding condition:	Fasted			Fasted
Vehicle/Formulation:	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water (v/v/v)			10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water (v/v/v)
Method of administration:	IV[a]	PO	PO	PO
Dose (mg/kg):	0.03	0.03	0.3	0.6[b]
Sample:	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte:	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat	Vericiguat
Assay:	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters (Geometric Mean (geometric standard deviation))				
CL_p (L/h/kg)	0.152 (1.20)	NA	NA	NA
Vd_{ss} (L/kg)	1.14 (1.17)	NA	NA	NA
$t_{½}$ (h)	5.39 (1.03)	5.67 (1.22)	6.95 (1.51)	4.94 (1.13)
AUC (µg·h/L)	197 (1.20)	141 (1.24)	1472 (1.12)	1950 (1.11)
AUC_{norm} (kg·h/L)	6.57 (1.20)	4.71 (1.24)	4.91 (1.12)	3.25 (1.11)
C_{max} (µg/L)	27.6 (1.02)	16.1 (1.12)	167 (1.15)	262 (1.21)
$C_{max,norm}$ (kg/L)	0.919 (1.02)	0.535 (1.12)	0.556 (1.15)	0.437 (1.21)
T_{max} (h)	1.00 (1.00)	1.44 (1.42)	1.82 (1.18)	0.500 (1.00)
Bioavailability (%)	NA	71.6 (1.09)	74.7 (1.19)	NC

[a] IV infusion (1 h).
[b] [^{14}C]vericiguat was administered (specific activity = 2.85 MBq/mg).
Abbreviations: F = female; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; PO = per oral; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; CL_p = plasma clearance; Vd_{ss} = volume of distribution at steady state; $t_{½}$ = terminal half-life; AUC = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; AUC_{norm} = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; $C_{max,norm}$ = C_{max} normalized to dose; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; NC = not calculated; MBq = megabecquerel.

2.6.5.4 薬物動態試験： 反復投与後の吸収

反復投与後の薬物動態については 2.6.6.3、2.6.7.7 を参照。

2.6.5.5 薬物動態試験： 組織分布

2.6.5.5- 1 Pharmacokinetics: Tissue Distribution in Male Wistar Unilever Rats Following a Single PO Dose

Test Article: Vericiguat
Report Numbers: 4.2.2.3.1 A50459

Species/Strain:	Rat/Wistar Unilever
Gender (M/F)/Number of animals:	M/7 (one per time point)
Feeding Condition:	Fasted[a]
Vehicle/Formulation:	10% Ethanol, 40% PEG 400, 50% demineralized water (v/v/v)
Method of Administration:	PO (gavage)
Dose (mg/kg):	3
Radionuclide:	[^{14}C]Vericiguat
Specific Activity:	2.85 MBq/mg
Method of Analysis:	Quantitative whole-body autoradiography[b]
Sampling Time:	1.0 to 168 h (post-dose)

Tissue or Matrix	**Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/L tissue)**						
	1 h	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
	Rat 491	**Rat 492**	**Rat 493**	**Rat 494**	**Rat 495**	**Rat 496**	**Rat 497**
Adipose tissue, brown	833	1130	870	174	4.84	<3.59	<3.30
Adipose tissue, white	194	242	230	46.8	<3.63	<3.31	<3.33
Adrenal gland (cortex)	3770	4880	4430	875	23.7	<3.31	<3.33
Adrenal gland (medulla)	~1440	~1710	1180	~294	~4.63	<3.31	<3.33
Adrenal gland (average)	3460	4390	3740	797	22.2	<3.31	<3.33
Aorta wall	852	1480	~2030	334	5.58	<3.67	<3.22
Blood (heart)	696	1020	905	164	4.16	<3.31	<3.22
Bone	44.8	66.2	54.5	14.8	<3.51	<3.31	<3.33
Bone marrow	625	929	898	148	<3.51	<3.31	<3.33
Brain	13.8	18.2	24.5	4.94	<3.08	<3.59	<3.30
Cardiac muscle	1220	1680	1490	280	6.10	<3.59	<3.30
Eye wall	440	598	~629	154	<3.08	<3.31	<3.33
Harderian gland	1610	2500	2730	502	11.7	<3.31	<3.33
Kidney (cortex)	3450	5780	4260	894	20.9	3.46	<3.33
Kidney (inner medulla)	1570	1710	2200	372	10.8	<3.31	<3.33

Tissue or Matrix	Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/L tissue)						
	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	72 h	168 h
	Rat 491	Rat 492	Rat 493	Rat 494	Rat 495	Rat 496	Rat 497
Kidney (outer medulla)	5130	5000	4690	1200	42.3	6.89	<3.33
Kidney (papilla)	1650	ND	1800	273	9.29	<3.31	<3.33
Kidneys (average)	3510	4650	4010	833	28.8	3.89	<3.33
Liver	2000	3060	2310	501	19.5	8.69	<3.33
Lungs	830	1000	833	184	3.62	<3.31	<3.33
Pancreas	1190	1730	1480	273	6.71	<3.31	<3.33
Seminal vesicles	305	423	714	208	5.11	<3.59	<3.22
Skeletal muscles (dorsal)	408	664	607	116	<3.08	<3.31	<3.33
Skin, dorsal	458	700	610	124	3.26	<3.31	<3.30
Skin, ventral	566	788	1100	538	4.09	<3.31	<3.33
Spleen	828	1060	963	182	4.21	<3.31	<3.33
Submandibulary glands	1230	1640	1500	271	6.53	<3.31	<3.33
Testes	86.5	163	403	222	4.73	<3.31	<3.33
Thymus	477	764	812	153	<3.51	<3.59	<3.22
Thyroid	1160	1580	1300	242	5.63	<3.67	<3.22

[a] Animals were fasted for approximately 14-16 h prior to administration and up to 4 h following administration. Animal sacrificed at 8 h post-dose received 1 pellet of food.
[b] Radioluminography method was used to quantitate radioactivity concentration in tissue.
~ = Rough estimation, since the measured area of interest was below 1 mm^2 (on average).
Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; PO = per oral; MBq = megabecquerel; ND = not determined.

2.6.5.5- 2 Pharmacokinetic Parameters for Radioactivity in Blood and Tissues Collected from Male Wistar Unilever Rats After a Single Oral Administration of [^{14}C]Vericiguat (3 mg/kg)

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.3.1 A50459

Tissue or Matrix	T_{max} (h)	Ceq_{max} (µg-eq/L)	$t_{½}$ (h)	$AUC_{(0-24)}$ (µg-eq·h/L)	$AUC_{(0-\infty)}$ (µg-eq·h/L)
Adipose tissue, brown	2	1130	2.78	5870	5890
Adipose tissue, white	2	242	1.74[a]	NC	1370
Adrenal gland (cortex)	2	4880	2.76	28100	28100
Adrenal gland (medulla)	2	1710	2.55	8810	8830
Adrenal gland (average)	2	4390	2.81	24800	24900
Aorta wall	4	2030	2.44	10200	10200
Blood (heart)	2	1020	2.69	5560	5580
Bone	2	66.2	2.12[a]	NC	365
Bone marrow	2	929	1.54[a]	NC	4910
Brain	4	24.5	1.73[a]	NC	127
Cardiac muscle	2	1680	2.62	9270	9300
Eye wall	4	629	1.97[a]	NC	3750
Harderian gland	4	2730	2.65	15400	15500
Kidney (cortex)	2	5780	2.70	28600	29200
Kidney (inner medulla)	4	2200	2.74	12100	12100
Kidney (outer medulla)	1	5130	3.04	33100	34200
Kidney (papilla)	4	1800	2.79	10500	10500
Kidneys (average)	2	4650	2.93	26400	27100
Liver	2	3060	3.03	16000	17100
Lungs	2	1000	2.62	5610	5630
Pancreas	2	1730	2.68	9270	9290
Seminal vesicles	4	714	2.86	4170	4190
Skeletal muscles (dorsal)	2	664	1.67[a]	NC	3470
Skin, dorsal	2	700	1.74[a]	3870	3880
Skin, ventral	4	1100	2.42	7730	7750
Spleen	2	1060	2.65	6000	6020

Tissue or Matrix	T_{max} (h)	Ceq_{max} (µg-eq/L)	$t_{½}$ (h)	$AUC_{(0-24)}$ (µg-eq·h/L)	$AUC_{(0-\infty)}$ (µg-eq·h/L)
Submandibular glands	2	1640	2.66	9190	9210
Testes	4	403	3.05	2850	2870
Thymus	4	812	1.66[a]	NC	4380
Thyroid	2	1580	2.65	8330	8350

[a] Rough estimate, due to regression with only 2 time points.
Abbreviations: Ceq_{max} = maximum equivalent concentration; T_{max} = time to Ceq_{max}; $t_{½}$ = half-life; $AUC_{(0-24)}$ = area under the concentration-time curve from 0 to 24 h; $AUC_{(0-\infty)}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; NC = not calculated.
Additional Information: Radioactivity concentrations in most tissues reached the lower quantification limit between 24 and 72 h post-dose. Therefore, half-life was calculated by using time points up to 24 h post-dose and was reported in the table. In the liver, a terminal half-life of ~41 h by using time points up to 72 h post-dose was also calculated.

2.6.5.5- 3 Pharmacokinetics: Tissue Distribution in Female Wistar Unilever Rats Following a Single PO Dose

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.3.1 A50459

Species/Strain:	Rat/Wistar Unilever
Gender (M/F)/Number of animals:	F/2 (one per time point)
Feeding Condition:	Fasted[a]
Vehicle/Formulation:	10% Ethanol, 40% PEG 400, 50% demineralized water (v/v/v)
Method of Administration:	PO
Dose (mg/kg):	3
Radionuclide:	[^{14}C]Vericiguat
Specific Activity:	2.85 MBq/mg
Method of Analysis:	Quantitative whole-body autoradiography[b]
Sampling Time:	2 h to 24 h (post-dose)

Tissue or Matrix	**Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/L tissue)**	
	2 h	**24 h**
	Rat 498	**Rat 499**
Adipose tissue, brown	1840	35.0
Adipose tissue, white	356	8.22
Adrenal gland (cortex)	6730	200
Adrenal gland (medulla)	~2070	~67.6
Adrenal gland (average)	6010	183
Aorta wall	2290	51.5
Blood (heart)	1470	33.2
Bone marrow	969	30.6
Brain	30.9	<3.25
Cardiac muscle	2410	56.6
Compact bone (femur)	43.3	<3.03
Eye wall	1240	26.0
Harderian gland	4016	112
Kidney (cortex)	4880	126
Kidney (inner medulla)	3860	79.8
Kidney (outer medulla)	10800	290
Kidney (papilla)	3090	64.9
Kidneys (average)	6250	168

Tissue or Matrix	Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/L tissue)	
	2 h	24 h
	Rat 498	Rat 499
Liver	3230	81.6
Lungs	1740	20.8
Ovaries	1310	28.2
Pancreas	2210	51.8
Skeletal muscles (dorsal)	882	21.9
Skin (dorsal)	1050	194
Skin (ventral)	799	21.0
Spleen	1570	34.7
Submandibular glands	2350	58.6
Thymus	1220	29.5
Thyroid	2270	53.5
Uterus	1480	43.8

[a] Animals were fasted for approximately 14-16 h prior to administration and up to 4 h following administration.
[b] Radioluminography method was used to quantitate radioactivity concentration in tissue.
~ = rough estimation, since the measured area of interest was below 1mm^2 (on average).
Abbreviations: F = female; PEG 400 = polyethylene glycol 400; PO = per oral; MBq = megabecquerel.

2.6.5.5- 4 Pharmacokinetics: Tissue Distribution in Male Long-Evans Rats Following a Single PO Dose

Test Article: Vericiguat
Report Numbers: 4.2.2.3.2 PH-38309, 4.2.2.3.1 A50459

Species/Strain:	Rat/Long-Evans
Gender (M/F)/Number of animals:	M/9 (one per time point)
Feeding Condition:	Fasted[a]
Vehicle/Formulation:	10% Ethanol, 40% PEG 400, 50% demineralized water (v/v/v)
Method of Administration:	PO (gavage)
Dose (mg/kg):	3
Radionuclide:	[^{14}C]Vericiguat
Specific Activity:	2.84 MBq/mg 4.2.2.3.2 PH-38309 2.85 MBq/mg 4.2.2.3.1 A50459
Method of Analysis:	Quantitative whole-body autoradiography[b]
Sampling Time:	1 to 336 h (post-dose)

Tissue or Matrix	**Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/L tissue)**								
	1 h	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**	**336 h**
	Rat 100[c]	**Rat 101[c]**	**Rat 102[c]**	**Rat 103[c]**	**Rat 104[c]**	**Rat 500[d]**	**Rat 501[d]**	**Rat 502[d]**	**Rat 503[d]**
Adipose tissue, brown	671	654	1090	267	(32.1)	9.01	<3.07	<2.87	<2.76
Adipose tissue, white	193	222	256	50.1	(7.29)	<3.24	<2.94	<2.87	<2.72
Adrenal gland (cortex)	3430	391	4490	1320	(130)	45.5	<3.11	<2.87	<2.72
Adrenal gland (medulla)	1150	~1240	~1350	~415	(~34.7)	~15.2	<3.11	<2.87	<2.72
Adrenal gland (average)	3010	3400	3840	1180	(118)	41.7	<3.11	<2.87	<2.72
Aorta wall	~691	866	1200	518	(43.0)	11.5	<2.94	<3.03	<2.59
Blood (heart)	571	640	844	239	(23.5)	9.79	<3.11	<3.03	<2.72
Bone	216	57.4	59.8	40.6	(3.75)	<3.07	<3.11	<3.03	<2.72
Bone marrow	535	601	735	214	(21.4)	6.77	<3.11	<2.87	<2.72
Brain	13.5	18.0	25.5	13.2	(<3.64)	<3.12	<3.07	<2.92	<2.59
Cardiac muscle	962	1060	1410	405	(35.1)	12.9	<2.94	<2.87	<2.76
Epididymides	270	481	836	350	(24.5)	NA	NA	NA	NA
Eye wall, pigmented	947	1520	3940	7020	(5400)	~3150	2480	1450	821
Harderian gland	1110	1470	2410	816	(69.1)	23.7	<3.11	<2.92	<2.72
Kidney (cortex)	1810	2240	2110	717	(99.3)	34.7	<3.11	<2.92	<2.72
Kidney (inner medulla)	1300	1250	1900	782	(55.0)	15.4	<3.11	<2.92	<2.72
Kidney (outer medulla)	2380	2060	3420	1150	(145)	50.2	5.00	<2.92	<2.72

Tissue or Matrix	Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/L tissue)								
	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	24 h	72 h	168 h	336 h
	Rat 100[c]	Rat 101[c]	Rat 102[c]	Rat 103[c]	Rat 104[c]	Rat 500[d]	Rat 501[d]	Rat 502[d]	Rat 503[d]
Kidney (papilla)	1090	854	1440	520	(42.5)	15.9	<3.11	<2.92	<2.72
Kidneys (average)	1900	1680	2690	910	(112)	35.0	<3.11	<2.92	<2.72
Liver	1500	2020	2050	621	(86.2)	36.4	12.1	3.42	<2.72
Lungs	775	934	1140	314	(31.7)	5.98	<3.11	<2.92	<2.72
Pancreas	1170	1360	1700	442	(40.5)	13.2	<3.11	<2.92	<2.72
Prostate	375	423	744	281	(20.6)	NA	NA	NA	NA
Seminal vesicles	987	983	644	268	(35.0)	~9.27	<3.11	<2.87	<2.72
Skeletal muscles (dorsal)	406	424	708	193	(16.1)	5.90	<3.11	<3.03	<2.72
Skin, high pigmented	346	403	968	329	(1050)	109	83.2	20.9	61.8
Skin, less pigmented	307	348	656	144	(297)	5.55	<3.11	<2.87	<2.72
Spleen	826	823	1000	211	(23.6)	7.52	<3.11	<2.92	<2.72
Submandibulary glands	996	1190	1580	397	(37.6)	13.6	<3.11	<2.92	<2.59
Testes	62.4	153	401	332	(26.7)	8.86	<3.07	<2.87	<2.72
Thymus	382	481	788	249	(20.7)	7.15	<2.94	<2.87	<2.76
Thyroid	659	865	1080	260	(20.7)	~10.6	<2.94	<3.03	<2.59

[a] Animals were fasted for approximately14-16 h prior to administration and up to 4 h following administration. Animal sacrificed at 8 h post-dose received 1 pellet of food. For animals sacrificed at 24 h post-dose, food was withdrawn about 16 h before sacrifice.
[b] Radioluminography method was used to quantitate radioactivity concentration in tissue.
[c] Corresponds to report 4.2.2.3.2 PH-38309.
[d] Corresponds to report 4.2.2.3.1 A50459.
~ = Rough estimation, since the measured area of interest was below 1 mm^2 (on average).
< = value below lower limit of quantitation.
( ) = Outlier due to inconsistent results (see Additional Information below for details).
Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; PO = per oral; MBq = megabecquerel; NA = not analyzed.
Additional information: Two QWBA studies were conducted in Long-Evans rats to fully assess the tissue distribution time course following oral administration of [^{14}C]vericiguat: 4.2.2.3.1 A50459 and 4.2.2.3.2 PH-38309. In 4.2.2.3.1 A50459, samples were collected from 24 h to 336 h post-dose. In a follow-up study 4.2.2.3.2 PH-38309, samples were collected up to 24 h post-dose. With the exception of melanin-related enrichments, the distribution patterns in the pigmented rats were virtually identical to those in male Wistar (albino) rats. However, Animal No. 104 (24 h post-dose; pigmented) in study 4.2.2.3.2 PH-38309 showed radioactivity concentrations in non-melanin containing tissues significantly higher than Animal No. 495 (24 h post-dose; albino) in study 4.2.2.3.1 A50459 [2.6.5.5- 1], despite comparable radioactivity concentrations at the other time points (1, 2, 4, and 8 h post-dose). Data from Animal No. 104 were therefore excluded from PK parameter calculations.

2.6.5.5- 5 Pharmacokinetic Parameters for Radioactivity in Blood and Tissues Collected from Male Long-Evans Rats After a Single Oral Administration of [^{14}C]Vericiguat (3 mg/kg)

Test Article: Vericiguat
Report Numbers: 4.2.2.3.2 PH-38309, 4.2.2.3.1 A50459

Tissue or Matrix	T_{max} (h)	Ceq_{max} (µg-eq/L)	$t_{½}$ (h)	$AUC_{(0-24)}$ (µg-eq·h/L)	$AUC_{(0-\infty)}$ (µg-eq·h/L)
Adipose tissue, brown	4.00	1090	2.99	6290	6330
Adipose tissue, white	4.00	256	1.70[a]	1410	1410
Adrenal gland (cortex)	4.00	4490	3.09	30200	30400
Adrenal gland (medulla)	4.00	1350	3.16	9460	9530
Adrenal gland (average)	4.00	3840	3.13	26400	26600
Aorta wall	4.00	1200	2.96	8560	8610
Blood (heart)	4.00	844	3.21	5440	5490
Bone marrow	4.00	735	3.03	4820	4850
Brain	4.00	25.5	4.22[a]	216	(222)
Cardiac muscle	4.00	1410	3.03	8990	9040
Compact bone	1.00	216	10.9	966	(1210)
Epididymides	4.00	836	3.19[a]	NC	5670
Eye wall, pigmented	8.00	7020	161	106000	792000
Harderian gland	4.00	2410	3.04	15200	15300
Kidney (cortex)	2.00	2240	3.45	16100	16200
Kidney (inner medulla)	4.00	1900	2.86	13200	13300
Kidney (outer medulla)	4.00	3420	3.35	22800	23900
Kidney (papilla)	4.00	1440	3.11	9730	9800
Kidneys (average)	4.00	2690	3.25	18000	18100
Liver	4.00	2050	43.4	14700	16600
Lungs	4.00	1140	2.68	7120	7150
Pancreas	4.00	1700	2.93	10600	10700
Prostate	4.00	744	2.85[a]	NC	(4810)
Seminal vesicles	1.00	987	3.27	6030	6070
Skeletal muscle	4.00	708	2.97	4190	4220
Skin, high pigmented	4.00	968	344	7480	43300
Skin, less pigmented	4.00	656	3.03	3520	3540
Spleen	4.00	1000	2.96	6070	6100
Submandibular glands	4.00	1580	3.02	9590	9650

Tissue or Matrix	T_{max} (h)	Ceq_{max} (µg-eq/L)	$t_{½}$ (h)	$AUC_{(0-24)}$ (µg-eq·h/L)	$AUC_{(0-\infty)}$ (µg-eq·h/L)
Testes	4.00	401	3.45	3580	3630
Thymus	4.00	788	3.00	4860	4890
Thyroid	4.00	1080	3.12	6580	6630

[a] Rough estimate, due to regression with only 2 time points.
(): Value in parentheses indicates that the extrapolated AUC ($AUC(t_{last-inf})$) was > 30% of $AUC_{(0-\infty)}$.
Abbreviations: Ceq_{max} = maximum equivalent concentration; T_{max} = time to Ceq_{max}; $t_{½}$ = terminal half-life; $AUC_{(0-24)}$ = area under the concentration-time curve from 0 to 24 h; $AUC_{(0-\infty)}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; NC = not calculated.
Additional Information: In Long-Evans (pigmented) rats, enrichment and persistence of radioactivity in melanin-bearing tissues were observed, indicating that [^{14}C]vericiguat-related radioactivity binds to melanin.

2.6.5.6 薬物動態試験： たん白結合

2.6.5.6- 1 Pharmacokinetics: In Vitro Plasma Protein Binding of Vericiguat and M-1

Test Article: Vericiguat, M-1

Report Number: 4.2.2.3.4 A50454, 4.2.2.3.5 PH-38631, 4.2.2.3.6 PH-39106, 4.2.2.3.7 PH-41292

Analytes:	[^{14}C]Vericiguat, M-1			
Test System:	Plasma; in vitro incubation matrix			
Method:	Ultrafiltration			
Assay:	Liquid scintillation counting; LC-MS/MS			
Species	**Vericiguat**		**M-1**	
	Concentration [µg-eq/L]	**Mean Percent Unbound**	**Concentration [µg/L]**	**Mean Percent Unbound**
CD-1 Mouse	93.2 to 9327	7.99	130 to 9479	15.2
Wistar Rat	93.1 to 9425	4.55	114 to 10248	3.13
CHBB:HM Rabbit	94.3 to 9078	3.69	102 to 9743[a]	4.48[a]
Beagle Dog	93.8 to 9234	10.2	113 to 11326	15.2
Cynomolgus Monkey	93.5 to 9278	5.55	-	-
Human	92.3 to 936	2.18	627 to 10161	1.63
	9395	4.05		
Human Serum Albumin (40 mg/mL)	899	5.03	-	-
α1-Acid Glycoprotein (0.7 mg/mL)	874	66.9	-	-
α-Globulin (12 mg/mL)	890	33.6	-	-
γ-Globulin (10 mg/mL)	877	53.0	-	-
Williams Medium + Fetal Calf Serum	93.0 to 9718	49.5	132 to 12999	18.8
HLM (0.05 mg/mL)	92.0, 707, 8108	80.4, 56.7, 39.5	775, 87048	92.4
HLM (0.1 mg/mL)	98.0, 680, 8194	73.7, 50.6, 34.1	820, 89090	89.7
HLM (0.5 mg/mL)	77.8, 897, 9298	55.3, 31.3, 19.6	842, 63669	88.1
rCYP1A1 (10 pmol/mL)	408, 3467	63.7, 34.6	-	-
rUGT1A1 (0.5 mg/mL)	204	49.7	-	-
rUGT1A9 (0.2 mg/mL)	83.7	66.7	-	-

[a] New Zealand White rabbit.
- = Not studied.
Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; CHBB:HM = Himalayan rabbit; HLM = human liver microsomes; rCYP1A1 = recombinant cytochrome P450 1A1; rUGT1A1 or 1A9 = recombinant uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 or 1A9.

2.6.5.6- 2 Pharmacokinetics: Blood-to-Plasma Partitioning

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.3.4 A50454

Analytes:	[^{14}C]Vericiguat	
Test System:	Fresh blood and plasma	
Assay:	Liquid scintillation counting	
Species	**Vericiguat Blood Concentration [µg-eq/L]**	**Mean C_{blood}/C_{plasma}**
Wistar Rat	104 to 10075	0.792
Beagle Dog	86.4 to 3908	0.874
Human	100 to 7949	0.656

2.6.5.7 薬物動態試験： 妊娠または授乳動物における試験（胎盤移行性）

2.6.5.7- 1 Pharmacokinetics: Concentrations of Radioactivity in Tissues of Pregnant Wistar Rats Following a Single PO Dose

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.3.3 R-9666

Species/Strain:	Rat/Wistar
Gestation day/Number of animals:	19/6 (one per time point)
Feeding Condition:	Fasted[a]
Vehicle/Formulation:	10% Ethanol, 40% PEG 400, 50% demineralized water (v/v/v)
Method of Administration:	PO
Dose (mg/kg):	3
Radionuclide:	[^{14}C]Vericiguat
Specific Activity:	2.85 MBq/mg
Method of Analysis:	Quantitative whole-body autoradiography[b]
Sampling Time:	1 to 48 h (post-dose)

Tissue or Matrix	**Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/g tissue)**					
	1 h	**2 h**	**4 h**	**8 h**	**24 h**	**48 h**
	Rat 7	**Rat 8**	**Rat 9**	**Rat 4**	**Rat 5**	**Rat 6**
Blood (LSC)[c,d]	0.376	0.705	0.896	0.703	0.015	0.008
Plasma (LSC)[c]	0.499	1.01	1.151	0.942	0.017	0.010
Adipose (brown)	0.689	0.722	1.646	0.886	0.016	0.010
Adipose (white)	0.163	0.160	0.378	0.227	BQL	BQL
Adrenal gland (cortex)	3.417	3.995	8.504	6.369	0.135	0.050
Adrenal gland (medulla)	1.303	1.320	3.711	4.148	0.094	0.026
Adrenal gland (average)	3.013	3.606	7.782	5.712	0.125	0.045
Amnion	1.448	4.561	6.645	3.798	0.070	0.061
Amniotic fluid	BQL	0.018	0.037	0.100	0.016	BQL
Aorta	0.732	1.306	1.821	1.739	0.016	BQL
Bile (in duct)	6.118	7.023	9.346	6.051	0.155	0.144
Blood (cardiac)	0.349	0.748	0.870	0.696	0.013	0.009
Bone (femur)	0.030	0.041	0.128	0.086	BQL	BQL
Bone marrow (femur)	0.439	0.644	1.158	0.827	0.019	0.008
Brain (total)	0.012	0.017	0.033	0.024	BQL	BQL

Tissue or Matrix	Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/g tissue)					
	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
	Rat 7	Rat 8	Rat 9	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Cecum (contents)	2.148	2.099	19.853	38.124	1.453	0.588
Cecum (wall)	0.705	1.314	2.263	17.693	0.132	0.062
Choroid plexus	0.281	0.472	0.900	0.603	BQL	BQL
Eye (lens)	BQL	0.024	0.023	0.037	0.027	0.012
Eye (uveal tract)	0.187	0.392	0.475	0.351	0.012	0.006
Eye (vitreous humor)	0.016	0.042	0.044	0.026	BQL	BQL
Harderian gland	1.112	1.850	3.037	2.679	0.052	0.023
Heart (myocardium)	0.753	1.194	1.848	1.271	0.027	0.012
Hypophysis	0.836	1.069	1.686	1.350	0.027	0.017
Kidney (cortex)	1.345	1.557	2.637	1.924	0.040	0.027
Kidney (inner medulla)	0.782	1.041	1.946	1.244	0.023	0.012
Kidney (outer medulla)	1.548	2.380	4.311	2.628	0.063	0.025
Kidney (average)	1.219	1.634	2.943	2.017	0.041	0.025
Large intestine (contents)	0.010	0.242	4.209	52.033	3.065	0.679
Large intestine (wall)	0.615	1.199	1.878	2.438	0.152	0.035
Liver	1.687	2.437	3.301	2.232	0.050	0.031
Lung	0.607	0.920	1.365	1.053	0.021	0.012
Lymph node	0.426	0.831	0.913	0.780	0.016	0.008
Mammary gland region	1.000	1.293	5.045	3.109	0.708	1.675
Ovaries	0.368	0.446	0.833	0.700	0.015	0.009
Pancreas	0.930	1.358	2.152	1.672	0.030	0.017
Pineal Body	0.702	0.974	1.535	1.127	BQL	BQL
Placenta	0.330	0.650	0.898	0.739	0.018	0.010
Preputial gland	0.699	1.185	2.100	1.612	0.074	0.044
Salivary gland	0.731	0.993	1.547	1.092	0.023	0.017
Skeletal muscle	0.238	0.430	0.719	0.576	0.013	BQL
Skin	0.217	0.291	0.991	0.352	0.659	0.428
Small intestine (contents)	46.339	42.447	49.404	32.363	1.001	0.808
Small intestine (wall)	1.919	76.871	5.425	6.182	0.218	0.034
Spinal cord	0.010	0.014	0.027	0.022	BQL	BQL
Spleen	0.587	0.873	1.288	0.993	0.022	0.012
Stomach (contents)	145.384	150.316	88.155	1.067	0.072	0.118
Stomach (gastric mucosa)	2.898	7.039	3.504	2.519	0.048	0.014
Thymus	0.343	0.596	0.919	0.709	0.015	0.008
Thyroid	0.755	1.078	1.647	1.131	0.026	0.012

Tissue or Matrix	Vericiguat Radioequivalents (µg-eq/g tissue)					
	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
	Rat 7	Rat 8	Rat 9	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Urinary bladder	0.539	0.717	0.951	4.735	0.043	0.019
Urinary bladder (contents)	1.541	0.791	3.207	10.945	0.055	0.056
Uterus	0.390	0.650	0.953	0.760	0.016	0.010
Vagina	0.368	0.659	0.825	0.743	0.027	0.007
Fetus (average)	0.123	0.294	0.448	0.492	0.016	0.009
Fetal blood	0.156	0.290	0.505	0.509	0.019	0.008
Fetal brain	0.040	0.093	0.175	0.184	BQL	BQL
Fetal liver	0.162	0.346	0.544	0.490	0.015	0.008
Fetal kidney	0.146	0.297	0.523	0.399	0.013	0.006
Fetal muscle	0.122	0.305	0.507	0.536	0.010	0.008
Fetal skin	0.118	0.303	0.491	0.685	0.028	0.012
Fetal intestine (highest)	0.190	0.524	0.853	1.081	0.213	0.072
Fetal adrenal	0.285	0.736	1.133	1.001	0.024	0.021

[a] Animals were fasted for approximately 12 h prior to administration and up to 4 h following administration.
[b] Radioluminography method was used to quantitate radioactivity concentration in tissue.
[c] Concentration in blood and plasma was expressed as µg-eq/mL.
[d] Blood was taken by ocular bleeding from each animal immediately prior to euthanasia.
Abbreviations: PEG 400 = polyethylene glycol 400; PO = per oral; MBq = megabecquerel; LSC = liquid scintillation counting; BQL = below quantifiable limit.
Lower limit of quantitation: 0.006 µg-equivalent/g tissue.

2.6.5.7- 2 Pharmacokinetic Parameters for Radioactivity in Blood, Plasma and Tissues Collected from Pregnant Female Wistar Rats after a Single Oral Administration of [^{14}C]Vericiguat (3 mg/kg)

Test Article: Vericiguat
Report Number: Report Number: 4.2.2.3.3 R-9666

Tissue or Matrix	T_{max} (h)	C_{max} (µg-eq/g)	$t_{½}$ (h)	$AUC_{(0-48)}$ (µg-eq·h/g)	$AUC_{(0-\infty)}$ (µg-eq·h/g)
Adipose (brown)	4.00	1.646	(6.614)	16.010	(16.105)
Adipose (white)	4.00	0.378	(5.437)	1.991	(3.772)
Adrenal gland (cortex)	4.00	8.504	(6.034)	101.912	(102.347)
Adrenal gland (medulla)	8.00	4.148	5.727	58.097	58.312
Adrenal gland (average)	4.00	7.782	(6.033)	91.928	(92.320)
Amnion	4.00	6.645	(7.252)	68.337	(68.975)
Amniotic fluid	8.00	0.100	(6.052)	1.273	(1.413)
Aorta	4.00	1.821	2.742	25.672	25.735
Blood (ocular - LSC)	4.00	0.896	(6.593)	11.548[b]	(11.624)
Bone (femur)	4.00	0.128	(6.972)	0.648	(1.513)
Bone marrow (femur)	4.00	1.158	(6.321)	13.625	(13.698)
Brain (total)	4.00	0.033	(8.706)	0.185	(0.486)
Cecum (wall)	8.00	17.693	(5.225)	189.779	(190.246)
Choroid plexus	4.00	0.900	(6.923)	4.895	(10.918)
Eye (lens)	8.00	0.037	24.240	1.180	1.600
Eye (uvea)	4.00	0.475	(7.222)	6.022	(6.085)
Eye (vitreous humor)	4.00	0.044	(5.270)	0.263	(0.461)
Harderian gland	4.00	3.037	(6.176)	41.104	(41.309)
Heart (myocardium)	4.00	1.848	(6.300)	21.482	(21.591)
Kidney (cortex)	4.00	2.637	(6.964)	31.956	(32.227)
Kidney (inner medulla)	4.00	1.946	(6.359)	21.226	(21.336)
Kidney (outer medulla)	4.00	4.311	(6.288)	45.891	(46.118)
Kidney (average)	4.00	2.943	(6.748)	33.789	(34.032)
Large intestine (wall)	8.00	2.438	6.759	35.888	36.229
Liver	4.00	3.301	(6.928)	38.938	(39.247)
Lung	4.00	1.365	(6.609)	17.176	(17.290)
Lymph node	4.00	0.913	(6.434)	12.628	(12.702)
Mammary gland region	4.00	5.045	NC	83.425[a]	NC
Ovaries	4.00	0.833	(6.800)	10.944	(11.032)

Tissue or Matrix	T_{max} (h)	C_{max} (µg-eq/g)	$t_{½}$ (h)	$AUC_{(0-48)}$ (µg-eq·h/g)	$AUC_{(0-\infty)}$ (µg-eq·h/g)
Pancreas	4.00	2.152	(6.446)	26.920	(27.078)
Pineal body	4.00	1.535	(8.974)	9.022[a]	(23.612)
Pituitary	4.00	1.686	(6.779)	21.742	(21.908)
Placenta	4.00	0.898	(6.862)	11.869	(11.968)
Plasma (LSC)	4.00	1.151	(6.514)	15.347	(15.441)
Preputial gland	4.00	2.100	(8.190)	26.905	(27.424)
Salivary gland	4.00	1.547	(7.157)	18.446	(18.621)
Skeletal muscle	4.00	0.719	3.285	8.904[a]	8.966
Skin	4.00	0.991	(38.544)	25.463	(49.262)
Small intestine (wall)	2.00	76.871	5.505	200.089	200.359
Spinal cord	4.00	0.027	(13.538)	0.156	(0.586)
Spleen	4.00	1.288	(6.686)	16.275	(16.390)
Stomach (gastric mucosa)	2.00	7.039	(5.607)	48.937	(49.050)
Thymus	4.00	0.919	(6.581)	11.480	(11.556)
Thyroid	4.00	1.647	(6.465)	19.287	(19.399)
Urinary bladder	8.00	4.735	(5.342)	52.906	(53.052)
Uterus	4.00	0.953	(6.845)	12.264	(12.363)
Vagina	4.00	0.825	6.197	11.886	11.948
Fetal adrenal	4.00	1.133	(7.752)	15.530	(15.765)
Fetal blood	8.00	0.509	(7.039)	7.672	(7.753)
Fetal brain	8.00	0.184	ND	1.073	ND
Fetal intestine (highest)	8.00	1.081	10.511	19.469	20.561
Fetal kidney	4.00	0.523	(6.988)	6.483	(6.543)
Fetal liver	4.00	0.544	(7.159)	7.609	(7.692)
Fetal muscle	8.00	0.536	(7.105)	7.757	(7.839)
Fetal skin	8.00	0.685	(7.227)	9.600	(9.725)
Fetus (average)	8.00	0.492	(7.372)	7.256	(7.352)

[a] This value is most likely overestimated due to insufficient data to obtain a reliable $t_{½}$ and an increase in tissue concentration at the last time point.
[b] Based on QWBA analysis, blood $AUC_{(0-48)}$ was 11.409 µg-eq·h/g and was used for calculation of tissue-to-blood ratios.
( ) = Values in parentheses for $AUC_{0-\infty}$ and $t_{½}$ should be treated with caution as those values were determined using an insufficient number of data points (i.e., <3 in terminal phase) and/or an r^2 value <0.85.
Abbreviations: C_{max} = maximum concentration; T_{max} = time to maximum measured concentration; $t_{½}$ = terminal half-life; $AUC_{(0-48)}$ = area under the concentration-time curve from 0 to 48 h; $AUC_{(0-\infty)}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; LSC = liquid scintillation counting; NC = not calculated due to abnormal PK profile with higher concentration at the last time point; ND = not determined due to insufficient data

.

2.6.5.7- 3 Pharmacokinetics: Radioactivity in Selected Organs/Body Fluids in Pregnant Wistar Rats and Fetuses Following a Single Oral Administration of [^{14}C]Vericiguat (3 mg/kg)

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.3.3 R-9666

Tissue	$AUC_{(0-48)}$ Ratio
Placenta/Maternal blood	1.0
Amniotic fluid/Maternal blood	0.1
Fetus (average)/Maternal blood	0.6
Fetus (average)/Placenta	0.6
Fetus (average)/Amniotic fluid	5.7
Fetal adrenal/Maternal adrenal	0.2
Fetal blood/Maternal blood	0.7
Fetal brain/Maternal brain	5.8
Fetal kidney/Maternal kidney	0.2
Fetal liver/Maternal liver	0.2
Fetal skeletal muscle/Maternal skeletal muscle	0.9

2.6.5.7 薬物動態試験： 妊娠または授乳動物における試験（乳汁排泄）

2.6.5.7- 4 Pharmacokinetics: Excretion in Milk of Rats

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.5.2 PH-40400

Species/Strain/Gender:	Rat/Wistar/Female
Lactation day / Number of animals per time point:	8 / 3 (total 6 animals)
Vehicle/Formulation:	10% Ethanol, 40% PEG 400, 50% demineralized water (v/v/v)
Method of administration:	IV (bolus; <30 sec)
Dose (mg/kg):	1
Radionuclide:	[^{14}C]Vericiguat
Radioactivity per animal (MBq/kg):	2.86 (0-8 h group); 2.85 (0-24 h group)
Analyte:	Total radioactivity
Assay:	Liquid scintillation counting
Sample Time Interval (h)	Excretion of radioactivity into milk (% of Administered Dose[a])
0-8 and 0-24	12.1 (15.9)

[a] Values represent the arithmetic mean (% CV) of the percent of administered dose.
Abbreviations: PEG = polyethylene glycol; IV = intravenous; MBq = megabecquerel.
Additional Information: Following a single IV administration of [^{14}C]vericiguat (1 mg/kg) to lactating rats on Lactation Day 8, the amount of total radioactivity in the whole litter was determined at 0-8 h and 0-24 h intervals, as an estimation of the excretion of radioactivity into milk.

2.6.5.8 薬物動態試験： その他の分布試験

その他の分布試験は実施しなかった。

2.6.5.9 薬物動態試験： In Vivoにおける代謝

2.6.5.9- 1 Pharmacokinetics: Metabolism In Vivo

Test Article: Vericiguat

Report Number: 4.2.2.4.1 PH-38984, 4.2.2.4.2 PH-39035, 4.2.2.4.3 PH-39087, 4.2.2.4.4 PH-38512

Species/Strain:	Mouse/CD-1	Rat/Wistar Unilever				Dog/Beagle	Human
Report Number:	4.2.2.4.1 PH-38984	4.2.2.4.2 PH-39035				4.2.2.4.3 PH-39087	4.2.2.4.4 PH-38512
Gender/Number of animals/subjects:	M/3[a]	M/3 (intact)	M/5 (intact)	M/3 (BDC)	M/3 (BDC)	F/4	M/6
Feeding conditions:	Fed	Fasted				Fasted	Fasted
Vehicle / Formulation:	10% Ethanol, 40% PEG 400, 50% demineralized water	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% demineralized water	PEG, 2.5% Polysorbate 20, 0.5% Levomenthol
Method of Administration:	PO	PO	PO	IV	PO	PO	PO
Dose:	1 mg/kg	3 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	0.6 mg/kg	5 mg
Compound:	[^{14}C]Vericiguat						
Specific Activity (MBq/mg):	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	0.74
Radioactivity Dose (MBq/kg):	2.85	8.14	8.13	2.69	7.88	1.62	~3.7[b]
Biological Samples:	Plasma	Plasma	Urine, Feces	Urine, Feces, Bile, GIT	Urine, Feces, Bile, GIT	Plasma, Urine, Feces	Plasma, Urine, Feces
Analyte(s):	Vericiguat and metabolites						
Assays:	LC-MS/MS, LSC						

[a] Three (3) animals per time point.
[b] Each subject received 3.7 MBq of [^{14}C]vericiguat.
Abbreviations: M = male; BDC = bile duct-cannulated; F = female; PEG = polyethylene glycol; PO = per oral; IV = intravenous; MBq = megabecquerel; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; GIT = gastrointestinal tract.

Presence[a] of Vericiguat and Metabolites in Plasma and Excreta from Non-Clinical Species and Human																		
Species	**Mouse**	**Rat (Intact)**			**Rat (BDC)**								**Dog**			**Human**		
Route	**PO**	**PO**			**PO**				**IV**				**PO**			**PO**		
	Plasma	**Plasma**	**Urine**	**Feces**	**Bile**	**Urine**	**Feces**	**GIT**	**Bile**	**Urine**	**Feces**	**GIT**	**Plasma**	**Urine**	**Feces**	**Plasma**	**Urine**	**Feces**
Vericiguat	98.4	97.0	9.23	69.9	5.16	4.07	35.3	8.52	8.25	10.6	29.6	2.62	97.7	2.35	19.3	26.6	9.00	42.6
M-1	1.5	1.6	0.524	5.12[b]	11.2	1.66	0.146[b]	-	13.6	1.19	-	-	1.6	0.401	50.9	72.1	40.8	-
M-2	-	-	0.380	-	-	0.388	-	-	-	0.772	-	-	-	0.209	-	-	-	-
M-3	-	-	0.535	4.40[c]	-	1.27	0.910[c]	0.323	-	1.23	0.420[c]	-	-	0.0544	7.86	-	-	-
M-4	-	-	-	[b]	-	-	[b]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-5	-	-	-	[c]	-	-	[c]	-	-	-	[c]	-	-	-	-	-	-	-
M-10	-	-	-	-	2.46	1.07	-	-	2.71	0.207	-	-	-	-	-	-	-	-
M-11	-	-	-	-	0.564	-	-	-	0.484	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-12	-	-	0.101[d]	-	3.61	0.740[d]	-	-	4.37	0.523[d]	-	-	-	0.0712	-	-	-	-
M-15	-	-	[d]	-	-	[d]	-	-	-	[d]	-	-	-	-	-	-	1.91	1.61
M-16	-	-	-	-	1.26	-	-	-	2.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Unknown	-	-	0.0582	1.71	10.5	0.699	-	0.135	11.6	0.249	-	-	-	1.15	9.95	-	0.945	0.994

[a] Values represent percentages relative to the total radioactivity $AUC_{(0-\infty)}$ (except $AUC_{(0-4h)}$ for dog) in the sample (plasma) or percentages relative to the administered dose (bile, urine, feces, GIT).
[b] M-1 coeluted with M-4; % radioactivity includes both M-1 and M-4.
[c] M-3 coeluted with M-5; % radioactivity includes both M-3 and M-5.
[d] M-12 coeluted with M-15; % radioactivity includes both M-12 and M-15.
- = Not detected.
Abbreviations: BDC = bile duct-cannulated; PO = per oral; IV = intravenous; GIT = gastrointestinal tract.

2.6.5.10 薬物動態試験： In Vitro 代謝

2.6.5.10- 1 Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.4.5 PH-39055

Study System:	In vitro		
Species/Matrix:	Rat, dog, and human hepatocytes		
Method for Hepatocytes:	[^{14}C]Vericiguat (2.5 μM) was incubated with primary fresh hepatocytes (suspension culture) from rat, dog and human at 37° C for 4 h.		
Analyte:	[^{14}C]Vericiguat		
Assays:	LC-MS/MS with off-line radiometric detection, LSC		
Prominent Metabolites Detected in Hepatocytes [% of Radioactivity]			
Metabolite	**Rat/Wistar (Average, n = 2)**	**Dog/Beagle (Average, n = 2)**	**Human (Average, n = 2)**
Vericiguat	76.9	85.3	98.3
M-1	6.2	12.2	1.2
M-2	0.9	Trace[a]	0.3
M-3	1.6	Trace[a]	Trace[a]
M-5	Trace[a]	-	-
M-10	3.6	1.2	-
M-11	1.3	-	-
M-12	1.6	Trace[a]	-
M-15	0.4	-	Trace[a]
M-16	4.5	Trace[a]	-
M-17	0.9	Trace[a]	-
M-18	0.4	Trace[a]	-

[a] Below the limit of detection (LOD) by means of HPLC-LSC, detected by LC-MS/MS.

- = Not detected.

Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; HPLC = high performance liquid chromatography.

Study System:	In vitro
Species/Matrix:	Mouse, rat, rabbit, dog, monkey, and human liver microsomes
Method for Microsomes:	[^{14}C]Vericiguat (5 µM) was incubated with liver microsomes (LM) at 37° C for 90 min in 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.4 + 1 mM EDTA) containing 1 mg/mL microsomal protein, and 1 mM NADPH.
Analyte:	[^{14}C]Vericiguat
Assays:	LC-MS/MS with off-line radiometric detection, LSC

Prominent Metabolites Detected in NADPH-fortified Liver Microsomes [% of Radioactivity]

Metabolite	Mouse/CD-1 (Male)	Mouse/NMRI (Male)	Rat/Wistar (Male)	Rat/Wistar (Female)	Rabbit/Himalaya (Female)	Dog/Beagle (Female)	Monkey/ Cynomolgus (Male, Female)	Human (Male, Female Pool)
Vericiguat	89.1	92.6	94.9	100	83.8	96.6	90.0	95.5
M-2	Trace[a]	Trace[a]	1.5	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]
M-3	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	0.6	Trace[a]
M-4	Trace[a]	Trace[a]	-	-	Trace[a]	Trace[a]	1.6	0.4
M-5	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]
M-8	Trace[a]	Trace[a]	-	-	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]	Trace[a]
M-9	10.9	7.4	3.6	Trace[a]	16.2	3.4	7.9	4.1

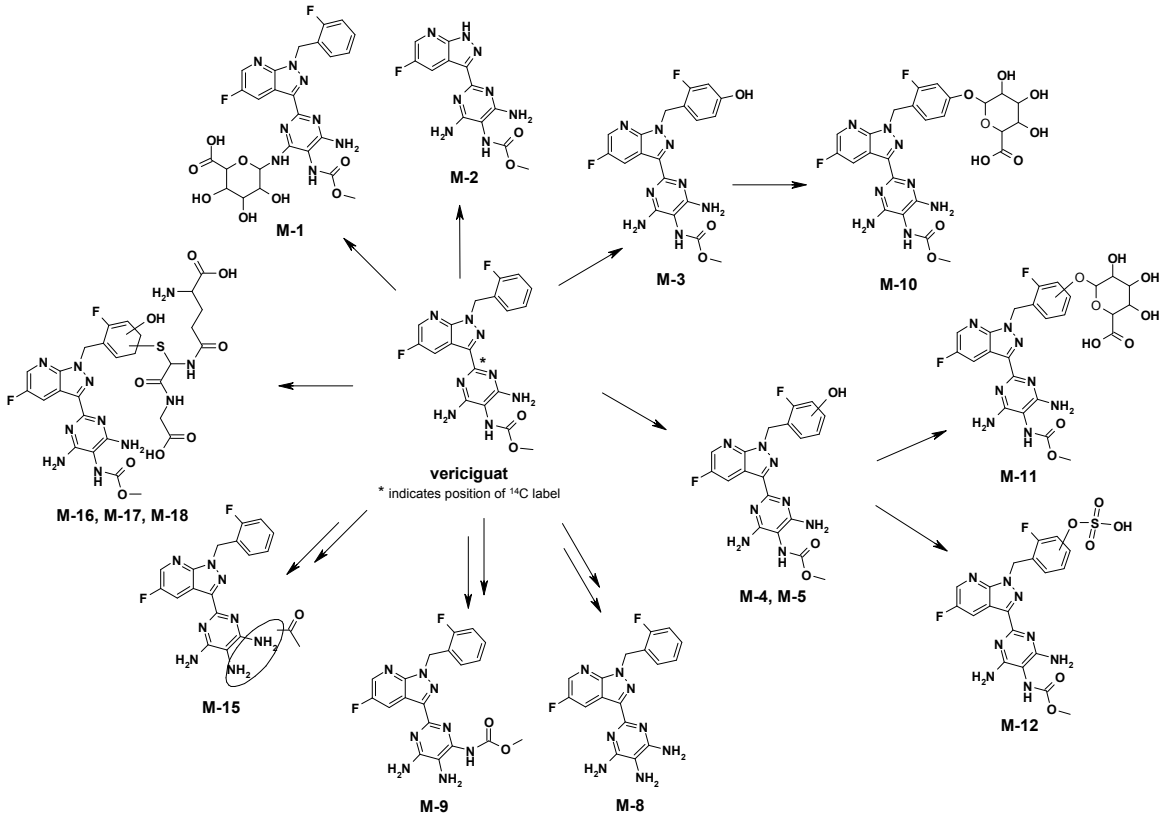
[a] Below the limit of detection (LOD) by means of HPLC-LSC, detected by LC-MS/MS.
- = Not detected.
Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography – tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; HPLC = high performance liquid chromatography

2.6.5.11 薬物動態試験： 推定代謝経路

2.6.5.11- 1 Pharmacokinetics: Proposed Metabolic Pathways Observed In Vitro and In Vivo

Test Article: Vericiguat

Report Number: 4.2.2.4.4 PH-38512, 4.2.2.4.1 PH-38984, 4.2.2.4.2 PH-39035, 4.2.2.4.5 PH-39055, 4.2.2.4.3 PH-39087



2.6.5.12 薬物動態試験： 薬物代謝酵素の誘導／阻害

薬物代謝酵素の阻害については 2.6.5.15- 8 及び 2.6.5.15- 9（CYP 阻害）、並びに 2.6.5.15- 10 及び 2.6.5.15- 11（UGT 阻害）を参照。
薬物代謝酵素の誘導については 2.6.5.15- 16 及び 2.6.5.15- 17 を参照。

2.6.5.13 薬物動態試験： 累積排泄

2.6.5.13- 1 Pharmacokinetics: Excretion in Rats and Dogs

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.5.1 A50438, 4.2.2.2.3 PH-38159

Report Number:	4.2.2.5.1 A50438			4.2.2.2.3 PH-38159
Species/Strain:	Rat/Wistar Unilever (intact)	Rat/Wistar Unilever (BDC)		Dog/Beagle
Gender / Number of animals:	M/5	M/3	M/3	F/4
Feeding conditions:	Fasted			
Vehicle / Formulation:	10% Ethanol, 60% PEG 400, 30% Demineralized Water (v/v/v)			
Method of administration:	PO	IV	PO	PO
Dose (mg/kg):	3	1	3	0.6
Compound:	[^{14}C]Vericiguat	[^{14}C]Vericiguat	[^{14}C]Vericiguat	[^{14}C]Vericiguat
Specific activity (MBq/mg):	2.85	2.85	2.85	2.85
Radioactivity per animal (MBq/kg):	8.13 ± 0.16	2.69 ± 0.070	7.88 ± 0.16	1.62 ± 0.003
Analyte(s)/Assay:	Total Radioactivity/Liquid Scintillation Counting			

Matrix	**Collection Time (h)**	**Mean (% CV) Cumulative Percent of Dose Recovered**			
Urine	8	7.09 (23.0)	10.1 (41.4)	3.82 (49.5)	2.38 (28.4)
	24	10.8 (17.0)	14.8 (47.8)	9.88 (17.2)	3.81 (23.0)
	48	11.2 (16.9)	NS	NS	4.24 (24.1)
	72	11.3 (16.9)	NS	NS	4.35 (23.1)
	96	11.3 (16.8)	NS	NS	4.38 (23.2)
	120	11.3 (16.8)	NS	NS	4.40 (23.3)
	144	11.4 (16.7)	NS	NS	4.41 (23.3)
	168	11.4 (16.7)	NS	NS	4.41 (23.3)
Feces	24	74.7 (3.54)	30.0 (19.2)	36.4 (20.8)	72.2 (13.9)
	48	81.0 (3.81)	NS	NS	85.7 (3.45)
	72	81.2 (3.77)	NS	NS	88.0 (3.38)
	96	81.2 (3.75)	NS	NS	88.8 (3.16)
	120	81.2 (3.76)	NS	NS	89.1 (3.17)
	144	81.2 (3.76)	NS	NS	89.2 (3.17)
	168	81.2 (3.76)	NS	NS	89.2 (3.16)

Matrix	Collection Time (h)	Mean (% CV) Cumulative Percent of Dose Recovered			
Bile	8	NS	34.4 (2.63)	11.9 (16.5)	NS
	24	NS	43.3 (2.68)	34.7 (21.0)	NS
Carcass	End of Study	0.0242 (85.2)	2.27 (27.7)	3.78 (9.70)	NS
GIT	End of Study	0.00231 (31.4)	2.62 (36.9)	8.98 (51.6)	NS
Total Recovered[a]		92.7 (3.05)	94.0 (3.93)	95.6 (0.716)	94.1 (3.77)

[a] Total includes radioactivity in cage wash.
Abbreviations: BDC = bile duct-cannulated; M = male; F = female; PEG = polyethylene glycol; IV = intravenous; PO = per oral; MBq = megabecquerel; CV = coefficient of variation; NS = no sample collected; GIT = gastrointestinal tract.
Additional Information: Following PO administration of [^{14}C]vericiguat to rats, all measured radioactivity values in the expired air within 24 h were below the lower limit of quantification, indicating that none of the radioactive dose was expired as $^{14}CO_2$.

2.6.5.13- 2 Pharmacokinetics: Excretion in Humans

Test Article: Vericiguat
Report Number: 5.3.3.1.5 PH-38476

Species:	Human
Gender / Number of subjects:	M/6
Feeding conditions:	Fasted[a]
Vehicle / Formulation:	Polyethylene glycol (PEG), Polysorbate 20 (2.5%), Levomenthol (0.5%)
Method of administration:	PO
Dose (mg):	5
Compound / Radioactivity Dose (MBq):	[^{14}C]Vericiguat / 3.7
Analyte(s) / Assay(s):	Total Radioactivity / Liquid Scintillation Counting

	Subject Number						**Mean Cumulative Percent of Dose Recovered**	**SD**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**		
	Urine							
0-12	15.2	17.9	22.4	18.4	20.4	15.7	18.3	2.75
0-24	24.4	27.4	32.8	28.6	30.8	25.0	28.2	3.27
0-48	36.0	38.6	43.3	39.6	42.4	34.9	39.1	3.35
0-72	41.8	44.2	48.8	45.3	47.7	40.5	44.7	3.24
0-96	45.5	48.3	51.9	48.5	50.4	44.0	48.1	2.95
0-120	47.5	50.8	53.7	50.4	51.7	46.3	50.1	2.73
0-144	48.5	52.4	54.7	51.7	52.5	47.5	51.2	2.71
0-168	49.1	53.5	55.3	52.5	52.9	48.4	52.0	2.67
0-192	49.4	54.3	55.7	53.0	53.1	49.1	52.4	2.65
0-216	49.6	54.7	56.0	53.4	53.2	49.4	52.7	2.69
0-240	49.8	55.1	56.1	53.7	53.2	49.7	52.9	2.67
0-264	49.8	55.3	56.1	53.9	53.2	49.9	53.0	2.67
0-288	49.9	55.5	56.1	54.0	53.2	50.0	53.1	2.66
0-312	49.9	55.5	56.1	54.0	53.2	50.0	53.1	2.66
0-336	49.9	55.5	56.1	54.0	53.2	50.0	53.1	2.66
	Feces							
0-24	0.400	0.00	0.700	0.400	2.10	0.00	0.600	0.782
0-48	20.7	0.600	3.40	7.10	14.6	0.00	7.73	8.31
0-72	20.7	12.2	25.1	18.8	29.9	0.700	17.9	10.3
0-96	39.6	25.5	31.4	30.7	39.6	32.1	33.2	5.51

	Subject Number						Mean Cumulative Percent of Dose Recovered	SD
	1	2	3	4	5	6		
	Feces							
0-120	44.7	25.5	34.7	36.9	43.0	37.5	37.1	6.83
0-144	47.2	33.2	38.5	38.7	43.0	41.7	40.4	4.75
0-168	48.8	36.0	38.5	41.9	44.5	41.7	41.9	4.49
0-192	49.3	37.7	41.6	42.5	45.2	44.0	43.4	3.87
0-216	49.3	38.5	42.6	43.2	45.5	45.9	44.2	3.65
0-240	49.7	39.5	43.1	44.0	45.6	46.8	44.8	3.47
0-264	49.9	39.9	43.1	44.7	45.6	47.3	45.1	3.44
0-288	49.9	40.1	43.1	44.8	45.6	47.6	45.2	3.42
0-312	49.9	40.1	43.1	44.8	45.6	47.6	45.2	3.42
0-336	49.9	40.1	43.1	44.8	45.6	47.6	45.2	3.42
	Urine and Feces							
Total Recovered	99.8	95.6	99.2	98.8	98.8	97.6	98.3	1.51

[a] Subjects consumed a light supper at least 10 h before drug administration. Fasting continued for 4 h after drug administration.
Abbreviations: M = male; PO = per oral; MBq = megabecquerel; SD = standard deviation.

2.6.5.14 薬物動態試験： 胆汁中排泄

胆汁中排泄については 2.6.5.13- 1 及び 2.6.5.9- 1 を参照。

2.6.5.15 薬物動態試験： 薬物相互作用

2.6.5.15- 1 Pharmacokinetics: Glucuronidation of Vericiguat in the Presence of Recombinant Human UGT Isoforms

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.1 PH-38399

Type of Study:	Recombinant UGT phenotyping
Methods:	Vericiguat (1 and 10 µM) was incubated with recombinant UDP-glucuronosyltransferases (UGT) isoforms treated with alamethicin (50 µg/mg microsomal protein) in the presence of UDPGA at 37°C for 60 min. The formation of M-1 was monitored by LC-MS/MS.
Analyte:	M-1
Assay(s):	LC-MS/MS

Human UGT Isoform	Concentration (µM)	Time (min)	M-1 Peak Area
UGT1A1	1.0	60	300,650
UGT1A3	1.0	60	13,761
UGT1A4	1.0	60	55,220
UGT1A6	1.0	60	-
UGT1A7	1.0	60	30,070
UGT1A8	1.0	60	80,186
UGT1A9	1.0	60	2,837,812
UGT1A10	1.0	60	-
UGT2B4	1.0	60	-
UGT2B7	1.0	60	-
UGT2B10	1.0	60	-
UGT2B15	1.0	60	-
UGT2B17	1.0	60	-
UGT1A1	10.0	60	1,524,720
UGT1A3	10.0	60	310,141
UGT1A4	10.0	60	618,644
UGT1A6	10.0	60	-
UGT1A7	10.0	60	230,744
UGT1A8	10.0	60	667,138
UGT1A9	10.0	60	6,682,106
UGT1A10	10.0	60	6,894

Human UGT Isoform	Concentration (µM)	Time (min)	M-1 Peak Area
UGT2B4	10.0	60	-
UGT2B7	10.0	60	2,073
UGT2B10	10.0	60	4,486
UGT2B15	10.0	60	-
UGT2B17	10.0	60	-

- = Not detected.
Abbreviations: UDP = Uridine 5'-diphosphate; UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.

2.6.5.15- 2 Pharmacokinetics: Glucuronidation of Vericiguat In Human Liver, Kidney or Intestinal Microsomes

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.1 PH-38399

Type of Study:	In vitro metabolism study in human liver, kidney or intestinal microsomes			
Method:	Vericiguat (1 and 10 µM) was incubated with human liver, renal or intestinal microsomes treated with alamethicin (50 µg/mg microsomal protein) in the presence of UDPGA at 37°C for 60 min. The formation of M-1 was monitored by LC-MS/MS.			
Analytes:	M-1			
Assay(s):	LC-MS/MS			
Microsomes	**Protein (mg/mL)**	**Concentration (µM)**	**Time (min)**	**M-1 (peak area)**
Human Liver Microsomes (HLM)	1.0	1.0	60	989,600
Human Kidney Microsomes (HKM)	1.0	1.0	60	2,486,181
Human Intestinal Microsomes (HIM)[a]	1.0	1.0	60	500,354
Human Intestinal Microsomes (HIM)[b]	1.0	1.0	60	941,108
Human Liver Microsomes (HLM)	1.0	10.0	60	7,093,487
Human Kidney Microsomes (HKM)	1.0	10.0	60	17,138,772
Human Intestinal Microsomes (HIM)[a]	1.0	10.0	60	5,239,332
Human Intestinal Microsomes (HIM)[b]	1.0	10.0	60	8,836,219

[a] Lot H0610.I.
[b] Lot 452210.
Abbreviations: UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.

2.6.5.15- 3 Pharmacokinetics: Effect of Isoform-selective UGT Inhibitors on the Formation of M-1 in Human Liver, Kidney or Intestinal Microsomes

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.1 PH-38399, 4.2.2.6.24 PH-41293

Type of Study:		In vitro chemical inhibition		
Methods:		Vericiguat (1 µM) was incubated with human liver, kidney or intestinal microsomes enriched with UDPGA at 37°C for 60 min, in the presence of UGT isoform selective inhibitors. The formation of M-1 was monitored by LC-MS/MS.		
Analyte:		M-1		
Assay(s):		LC-MS/MS		
Inhibitor	**Inhibitor Concentration (µM)**	**M-1 Formation (Percent of Control)**		
		Human Liver Microsomes (HLM)	**Human Kidney Microsomes (HKM)**	**Human Intestinal Microsomes (HIM)**
Atazanavir (UGT1A1)	5.0	75.0[a] / 55.2[b]	94.8	73.1
Hecogenin (UGT1A4)	10.0	96.2[a]	101.7	96.6
Niflumic acid (UGT1A9)	5.0	49.8[a] / 41.2[b]	15.1	90.3
Mefenamic acid (UGT1A9)	10.0	85.2[a]	73.0	86.9

[a] Lot MP004.

[b] Lot 438294.

Abbreviations: UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.

Additional information: Chemical inhibition experiments with atazanavir and niflumic acid were conducted with two lots of human liver microsomes.

2.6.5.15- 4 Pharmacokinetics: Correlations between UGT Isoform-Selective Activities and Formation of M-1 in Human Liver Microsomes

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.1 PH-38399

Type of Study:	In vitro correlation	
Method:	Vericiguat, 17β-estradiol, propofol, (R)-2-flurbiprofen or (S)-oxazepam were incubated with human liver microsomes from single donor (n=20 donors) in the presence of UDPGA. The glucuronide formation rates from 17β-estradiol, propofol, (R)-2-flurbiprofen or (S)-oxazepam were correlated with the glucuronide formation rate from vericiguat.	
Analyte:	Vericiguat, 17β-estradiol, propofol, (R)-2-flurbiprofen, (S)-oxazepam and their corresponding glucuronides	
Assay(s):	LC-MS/MS	
Human UGT Isoform	**Glucuronide of Selective Substrate**	**Correlation of Coefficient (R^2) M-1 Formation**
UGT1A1	17β-Estradiol 3-glucuronide	0.610
UGT1A9	Propofol Glucuronide	0.728
UGT2B7	(R)-flurbiprofen Glucuronide	0.170
UGT2B15	(S)-oxazepam Glucuronide	0.173
UGT1A1+1A9	17β-Estradiol 3-glucuronide + Propofol Glucuronide	0.794

Abbreviations: UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase.

2.6.5.15- 5 Pharmacokinetics: Kinetic Characterization of UGT1A1 and UGT1A9-Catalyzed Glucuronidation of Vericiguat

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.1 PH-38399, 4.2.2.6.24 PH-41293

Type of Study:	Enzyme kinetics study		
Method:	For K_m determination, vericiguat (0.5 - 80 µM) was incubated with recombinant UGT1A1 (1 mg/mL), UGT1A9 (0.2 mg/mL), or human liver microsomes (0.5 mg/mL) in the presence of UDPGA at 37°C for 30 or 60 min. For unbound intrinsic clearance determination, vericiguat (0.5 or 0.2 µM) was incubated with recombinant UGT1A1 (0.5 mg/mL) or UGT1A9 (0.2 mg/mL), respectively, in the presence of UDPGA at 37°C for up to 60 min. The formation of M-1 was monitored by LC-MS/MS.		
Analyte:	M-1		
Assay(s):	LC-MS/MS		
Kinetic Parameters			
	HLM	**UGT1A1**	**UGT1A9**
K_m (µM)	21.3	11.5	1.8
$CL_{int,u}$ (µL/min/mg microsomal protein)[a]	0.389	0.165	0.224
$CL_{int,u}$ (µL/min/mg microsomal protein)[b]	0.453	0.164	0.289

[a] Linear fit was used for first-order rate constant (k) calculation.
[b] Log-linear fit was used for first-order rate constant (k) calculation.
Abbreviations: UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase; UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; HLM = human liver microsomes; $Cl_{int,u}$ = unbound intrinsic clearance; RAF = relative activity factor.
Additional information: Isoform specific substrates estradiol (0.5 µM; UGT1A1) and propofol (1 µM; UGT1A9) were incubated with human liver microsomes and respective recombinant UGT isoforms, and the corresponding metabolite was monitored by LC-MS/MS. The first-order rate constant (k) used for intrinsic clearance estimation was calculated based on the ratio of the amounts of the glucuronide metabolite formed to the initial substrate concentration vs time by using either a log-linear fit, or a linear fit with data points from the initial reaction phase (up to approx. 20% turnover). The RAF value was calculated as the ratio of unbound intrinsic clearance in human liver microsomes to that obtained in recombinant isoform. RAF was 1.23 (using log-linear and linear fit) for UGT1A1-mediated estradiol 3-glucuronidation, and 0.09 (using log-linear fit) and 0.11 (using linear fit) for UGT1A9-mediated propofol glucuronidation. Vericiguat was incubated with recombinant UGT1A1 and UGT1A9 to obtain unbound intrinsic clearances, which were then scaled with RAF values to estimate the unbound intrinsic clearances of vericiguat in the liver (µL/min/mg microsomal protein). Unbound intrinsic clearance in HLM is the sum of that in UGT1A1 and UGT1A9. Based on the data, the contribution of UGT1A1 and UGT1A9 to the glucuronidation of vericiguat in the liver is about 40% and 60%, respectively

2.6.5.15- 6 Pharmacokinetics: Identification of Human CYP Isoforms Involved in the Oxidative Biotransformation of Vericiguat In Vitro

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.2 PH-39129

Type of Study:	CYP phenotyping																				
Methods:	Vericiguat (1 μM) was incubated with recombinant CYPs (40 pmol/mL) in the presence of NADPH at 37°C for 30 min.																				
Analyte:	[^{14}C]Vericiguat																				
Assay(s):	LC-MS/MS with off-line radiometric detection; liquid scintillation counting (LSC)																				
Metabolite	**Human CYP Isozymes**																				
	1A1	**1A2**	**1B1**	**2A6**	**2B6**	**2C8**	**2C9**	**2C18**	**2C19**	**2D6**	**2E1**	**2J2**	**3A4**	**3A5**	**3A7**	**4A11**	**4F2**	**4F3A**	**4F3B**	**4F12**	**19A1**
Vericiguat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	trace	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M-9	+	trace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	trace	+	trace	-	-	-	-	-	-	-
M-20	trace	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = Detected by mass spectrometry and radioactivity.
- = Not detected.
trace = detected by LC-MS only.
Abbreviations: CYP = cytochrome P450; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.
Additional information: It is noted that CYP-mediated metabolism is a minor clearance pathway for vericiguat.

2.6.5.15- 7 Pharmacokinetics: Inhibition Potential of Various Drugs on the Glucuronidation of Vericiguat In Vitro

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.3 PH-38190

Type of Study:	In vitro drug-drug interactions (DDIs)
Species/Matrix:	Human/Liver microsomes
Methods:	Vericiguat (1 µM) was incubated with human liver microsomes (1 mg/mL) enriched with UDPGA, in the presence of six different concentrations of potential co-medications.
Analyte:	M-1
Assay(s):	LC-MS/MS

Inhibitor	Indication(s)	Highest Inhibitor Concentration (µM)	Mean IC_{50} (µM)	$[I]_{max, total}$ (µM)[a]	f_u	$[I]_{max, total} / (IC_{50})$	$[I]_{max, unbound} / (IC_{50})$
Acetaminophen	Analgetics	1500	>1500	132.20	0.80	0.088	0.071
Amitriptyline	Antidepressants	50	>50	0.23	0.052	0.005	0.000
Atazanavir	Antiviral	100	>100	7.66	0.14	0.077	0.011
Atorvastatin	Hypolipidemic drugs	10	>10	0.03	0.02	0.003	0.000
Axitinib	Anticancer agents	50	>50	0.16	0.01	0.003	0.000
Bilirubin	Various	50	>50	NA	NA	NC	NC
Carvedilol	Antiarrhythmic agents	100	5.8	0.26	0.05	0.045	0.002
Cyclosporine	Immunosuppressants	100	>100	1.11	0.07	0.011	0.001
Dapagliflozin	Antidiabetic drugs	50	>50	0.39	0.09	0.008	0.001
Dasatinib	Anticancer agents	10	>10	0.13	0.04	0.013	0.001
Diclofenac	Analgetics	100	>100	6.28	0.005	0.063	0.000
Diflunisal	Analgetics	100	>100	248.00	0.01	2.480	0.025
Erlotinib	Anticancer agents	100	>100	6.06	0.1	0.061	0.006
Efavirenz	Antiviral	200	168.4	12.60	0.00375	0.075	0.000
17α-Ethynylestradiol	Various	50	>50	NA	NA	NC	NC
Etoposide	Anticancer agents	100	>100	8.00	0.04	0.080	0.003
Febuxostat	Gout/Hyperuricemia	200	183.4	16.78	0.007	0.092	0.001
Fenofibrate	Hypolipidemic drugs	250	>250	23.83	0.01	0.095	0.001
Fluconazole	Antifungal azoles	1500	>1500	34.60	0.89	0.023	0.021
Flurbiprofen	Analgetics	1000	664.4	65.50	0.005	0.099	0.000
Gefitinib	Anticancer agents	100	>100	0.80	0.1	0.008	0.001
Gemfibrozil	Hypolipidemic drugs	1000	144.4	100.00	0.03	0.693	0.021
Ibuprofen	Analgetics	50	>50	0.30	0.01	0.006	0.000

Inhibitor	Indication(s)	Highest Inhibitor Concentration (μM)	Mean IC_{50} (μM)	$[I]_{max, total}$ (μM)[a]	f_u	$[I]_{max, total}$ / (IC_{50})	$[I]_{max, unbound}$ / (IC_{50})
Imatinib	Anticancer agents	50	>50	4.41	0.05	0.088	0.004
Indinavir	Antiviral	200	>200	9.80	0.39	0.049	0.019
Indomethacin	Various	100	>100	6.70	0.1	0.067	0.007
Itraconazole	Antifungal azoles	100	>100	0.90	0.002	0.009	0.000
Ketoconazole	Antifungal azoles	100	>100	3.20	0.01	0.032	0.000
Ketoprofen	Analgetics	200	>200	15.30	0.01	0.077	0.001
Lapatinib	Anticancer agents	50	>50	4.20	0.01	0.084	0.001
Lopinavir	Antiviral drugs	200	>200	15.59	0.015	0.078	0.001
Lovastatin	Hypolipidemic drugs	100	>100	0.10	0.05	0.001	0.000
Mefenamic acid	Analgetics	100	26.1	80.00	0.1	3.065	0.307
Montelukast	Asthma	50	33.1	0.89	0.01	0.027	0.000
Mycophenolic acid	Immunosuppressants	1000	296.2	60.00	0.025	0.203	0.005
Naproxen	Analgetics	500	>500	408.00	0.003	0.816	0.002
Nelfinavir	Antiviral	100	>100	5.00	0.015	0.050	0.001
Nifedipine	Antihypertensive drugs	50	44	0.23	0.04	0.005	0.000
Niflumic acid	Analgetics	100	4.7	25.20	0.1	5.362	0.536
Nilotinib	Anticancer agents	100	>100	4.30	0.02	0.043	0.001
Omeprazole	Proton Pump Inhibitors	100	>100	3.50	0.05	0.035	0.002
Paclitaxel	Anticancer agents	50	>50	0.85	0.07	0.017	0.001
Pazopanib	Anticancer agents	100	13.7	132.00	0.01	9.635	0.096
Phenylbutazone	Analgetics	50	>50	NA	NA	NC	NC
Phenytoin	Anticonvulsants	1000	>1000	80.00	0.11	0.080	0.009
Probenecid	Gout/Hyperuricemia	2000	>2000	245.00	0.09	0.123	0.011
Propranolol	Antiarrhythmic agents	50	>50	0.17	0.13	0.003	0.000
Propofol	Various	200	>200	20.00	0.0145	0.100	0.001
Raloxifene	SERM	20	>20	0.00	0.05	0.000	0.000
Ritonavir	Antiviral	200	>200	15.00	0.015	0.075	0.001

Inhibitor	Indication(s)	Highest Inhibitor Concentration (μM)	Mean IC_{50} (μM)	$[I]_{max, total}$ (μM)[a]	f_u	$[I]_{max, total}$ / (IC_{50})	$[I]_{max, unbound}$ / (IC_{50})
Saquinavir	Antiviral	100	>100	1.41	0.02	0.014	0.000
Sildenafil	Various	100	>100	0.32	0.04	0.003	0.000
Theophylline	Asthma	2500	>2500	111.00	0.44	0.044	0.020
Valproic acid	Anticonvulsants	100	>100	0.24	0.07	0.002	0.000
Verapamil	Antiarrhythmic agents	100	>100	0.55	0.1	0.006	0.001
Zidovudine	Antiviral	250	>250	6.00	0.75	0.024	0.018

[a] Values were obtained from different sources in literature.
Abbreviations: UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; $[I]_{max, total}$ = clinical total maximum plasma concentration; f_u = unbound fraction in plasma; $[I]_{max, unbound}$ = clinical unbound maximum plasma concentration; NA = not applicable; NC = not calculated.
Additional Information: The obtained IC_{50} values were compared with maximal unbound drug plasma concentration ($C_{max, u}$) at a therapeutic dose to assess the potential for drug-drug interaction, as described by the quotient of $[I]_{max, unbound}/IC_{50}$. Among all the drugs tested, mefenamic acid and niflumic acid had the highest quotient of $[I]_{max, unbound}/IC_{50.}$ A clinical drug-drug interaction study with mefenamic acid was conducted to further assess the risk.

2.6.5.15- 8 Pharmacokinetics: Reversible and Time-Dependent Inhibition of Human CYP isoforms by Vericiguat

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.4 PH-38684, 4.2.2.6.6 PH-40742

Type of Study:	CYP Inhibition by vericiguat				
Methods:	Individual probe substrate of CYP enzymes was incubated with human liver microsomes or recombinant CYP enzymes enriched with NADPH, in the presence of vericiguat (1.6-50 µM) or positive control inhibitors.				
Analytical Method:	LC-MS/MS				
CYP Isoform	**Probe Reaction**	**Reversible Inhibition**	**30-Minute Pre-incubation without NADPH**	**30-Minute Pre-incubation with NADPH**	**Potential for TDI**
		IC_{50} (µM)	**IC_{50} (µM)**	**IC_{50} (µM)**	
1A1	Granisetron 7-Hydroxylation	2.9	ND	ND	ND
1A2	Phenacetin O-Deethylation	>50	>50	>50	No
2A6	Coumarin 7-Hydroxylation	>50	ND	ND	ND
2B6	Bupropion Hydroxylation	>50	>50	>50	No
2C8	Amodiaquine N-Deethylation	>50	>50	>50	No
2C9	Diclofenac 4´-Hydroxylation	>50	>50	>50	No
2C19	Mephenytoin 4´-Hydroxylation	>50	>50	>50	No
2D6	Dextromethorphan O-Demethylation	>50	>50	>50	No
2E1	Chlorzoxazone 6-Hydroxylation	>50	ND	ND	ND
2J2	Ebastine Hydroxylation	>50	ND	ND	ND
3A4	Midazolam 1´-Hydroxylation	>50	ND	>50	No
3A4	Testosterone 6β-Hydroxylation	>50	ND	>50	No

Note: An assessment of DDI risk between vericiguat and co-administered substrates of CYP enzymes, based on the 2020 FDA and 2012 EMA guidances, is provided in [2.6.5.15- 12] and [2.6.5.15- 13], respectively.
Abbreviations: CYP = cytochrome P450; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; TDI = time-dependent inhibition; ND = not determined.
Additional Information: The potential of vericiguat to inhibit human cytochrome P450 isoforms was evaluated in vitro using pooled human liver microsomes (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, and 3A4), or recombinant enzymes (CYP1A1 and 2J2). Potential for time-dependent inhibition of CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 2D6, and 3A4 was assessed by pre-incubating vericiguat with human liver microsomes in the absence (not for CYP3A4) or presence of NADPH for 30 min. Known reversible and time-dependent inhibitors of the respective enzymes were included as positive controls

2.6.5.15- 9 Pharmacokinetics: Reversible and Time-Dependent Inhibition of Human CYP isoforms by M-1

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.5 PH-38683, 4.2.2.6.6 PH-40742

Type of Study:	CYP Inhibition by M-1				
Methods:	Individual probe substrate of CYP enzymes was incubated with human liver microsomes or recombinant CYP enzymes enriched with NADPH, in the presence of M-1 (3.1-100 µM) for reversible inhibition of CYPs and time-dependent inhibition of CYP3A4. For time-dependent inhibition of other CYPs, a different concentration range of M-1 (1.6-50 µM) was used.				
Analytical Method:	LC-MS/MS				
CYP Isoform	**Probe Reaction**	**Reversible Inhibition**	**30-Minute Pre-incubation without NADPH**	**30-Minute Pre-incubation with NADPH**	**Potential for TDI**
		IC_{50} (µM)	**IC_{50} (µM)**	**IC_{50} (µM)**	
1A1	Granisetron 7-Hydroxylation	9.9	ND	ND	ND
1A2	Phenacetin O-Deethylation	>100	>50	>50	No
2A6	Coumarin 7-Hydroxylation	>100	ND	ND	ND
2B6	Bupropion Hydroxylation	>100	>50	>50	No
2C8	Amodiaquine N-Deethylation	>100	>50	>50	No
2C9	Diclofenac 4′-Hydroxylation	>100	>50	>50	No
2C19	Mephenytoin 4′-Hydroxylation	87	>50	>50	No
2D6	Dextromethorphan O-Demethylation	>100	>50	>50	No
2E1	Chlorzoxazone 6-Hydroxylation	>100	ND	ND	ND
2J2	Ebastine Hydroxylation	>100	ND	ND	ND
3A4	Midazolam 1′-Hydroxylation	>100	ND	>100	No
3A4	Testosterone 6β-Hydroxylation	>100	ND	>100	No

Note: An assessment of DDI risk between M-1 and co-administered substrates of CYP enzymes, based on the 2020 FDA and 2012 EMA guidances, is provided in [2.6.5.15- 14] and [2.6.5.15- 15], respectively.
Abbreviations: CYP = cytochrome P450; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; TDI = time dependent inhibition; ND = not determined.
Additional Information: The potential of M-1 to inhibit human cytochrome P450 isoforms was evaluated in vitro using pooled human liver microsomes (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, and 3A4), or recombinant enzymes (CYP1A1 and 2J2). Potential for time-dependent inhibition of CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4 was assessed by pre-incubating M-1 with human liver microsomes in the absence (not for CYP3A4) or presence of NADPH for 30 min. Known reversible and time-dependent inhibitors of the respective enzymes were included as positive controls.

2.6.5.15- 10 Pharmacokinetics: Inhibition of Human UGT Isoforms by Vericiguat

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.7 A57470

Type of Study:	UGT Inhibition by Vericiguat	
Methods:	In vitro incubation of individual probe substrates of UGT enzymes with human liver microsomes enriched with UDPGA, in the presence of vericiguat (1-50 µM).	
Analytical Method:	LC-MS/MS	
UGT Isoform	**Substrate**	**IC_{50} (µM)**
Various	Estradiol (estradiol 17-glucuronide)	>50
1A1	Estradiol (estradiol 3-glucuronide)	>50
1A4	Trifluoperazine	>50
1A4	1'-Hydroxymidazolam (1'-hydroxymidazolam *N*-glucuronide)	>50
1A6	α-Naphthol	>50
1A9	Propofol	10.6 (K_i: 6.6)
2B4	1'-Hydroxymidazolam (1'-hydroxymidazolam *O*-glucuronide)	>50
2B7	3'-Azido-3'-deoxythymidine	>50

Note: An assessment of DDI risk between vericiguat and co-administered substrates of UGT enzymes, based on the 2020 FDA and 2012 EMA guidances, is provided in [2.6.5.15- 12] and [2.6.5.15- 13], respectively.
Abbreviations: UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase; UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; K_i = inhibition constant.
Additional Information: Vericiguat exhibited an IC_{50} value of 10.6 µM toward UGT1A9-mediated propofol glucuronidation. Subsequently, a detailed inhibition study using propofol as the probe substrate at 3 concentrations indicated a K_i value of 6.6 µM, consistent with the IC_{50} value. Known inhibitors of the respective UGT isoforms were included as positive controls.

2.6.5.15- 11 Pharmacokinetics: Inhibition of Human UGT Isoforms by M-1

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.8 PH-38890

Type of Study:	UGT Inhibition by M-1	
Methods:	In vitro incubation of individual probe substrates of UGT enzymes with human liver microsomes enriched with UDPGA, in the presence of M-1 (1.6-50 µM).	
Analytical Method:	LC-MS/MS	
UGT Isoform	**Substrate (Product)**	**IC_{50} (µM)**
		M-1
Various	Estradiol (Estradiol 17-glucuronide)	>50
1A1	Estradiol (Estradiol 3-glucuronide)	>50
1A1	SN-38 (SN-38 glucuronide)	>50
1A4	Trifluoperazine (Trifluoperazine glucuronide)	>50
1A4	1'-Hydroxymidazolam (1'-Hydroxymidazolam *N*-glucuronide)	>50
1A6	α-Naphthol (Naphthol glucuronide)	>50
1A9	Propofol (Propofol glucuronide)	>50
2B4	1'-Hydroxymidazolam (1'-Hydroxymidazolam *O*-glucuronide)	>50
2B7	Tarenflurbil (Tarenflurbil glucuronide)	>50

Note: An assessment of DDI risk between M-1 and co-administered substrates of UGT enzymes, based on the 2020 FDA and 2012 EMA guidances, is provided in [2.6.5.15- 14] and [2.6.5.15- 15], respectively.
Abbreviations: UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase; UDPGA = Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition.
Additional information: Known inhibitors of the respective UGT isoforms were included as positive controls.

2.6.5.15- 12 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Enzyme Inhibition by Vericiguat (FDA)

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.4 PH-38684, 4.2.2.6.7 A57470

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between vericiguat and co-administered substrates of various enzymes, based on the FDA guidance (2020)[a]							
Enzyme	**Model**	**$[I]_{max,u}$ (µM)**	**$[I]_{in,max,u}$ (µM)**	**$[I]_{gut}$ (µM)**	**K_i[b] (µM)**	**$1+[I]/K_i$**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
	Systemic						
CYP1A1	Basic	0.02	-	-	0.92[c]	1.019	1.02
CYP1A1	Mechanistic Static[d]	-	0.03	-	0.92	1.031	1.25
CYP1A2	Basic	0.02	-	-	>9.88[e]	<1.002	1.02
CYP2A6	Basic	0.02	-	-	>9.88	<1.002	1.02
CYP2B6	Basic	0.02	-	-	>4.90[f]	<1.004	1.02
CYP2C8	Basic	0.02	-	-	>9.88	<1.002	1.02
CYP2C9	Basic	0.02	-	-	>9.88	<1.002	1.02
CYP2C19	Basic	0.02	-	-	>4.90	<1.004	1.02
CYP2D6	Basic	0.02	-	-	>9.88	<1.002	1.02
CYP2E1	Basic	0.02	-	-	>8.53[g]	<1.002	1.02
CYP2J2	Basic	0.02	-	-	>9.88[h]	<1.002	1.02
CYP3A4/midazolam	Basic	0.02	-	-	>9.88	<1.002	1.02
CYP3A4/testosterone	Basic	0.02	-	-	>8.53	<1.002	1.02
	Intestinal						
CYP3A4/midazolam	Basic	-	-	94	>9.88	<11	11
CYP3A4/testosterone	Basic	-	-	94	>8.53	<12	11
	Systemic						
UGT1A1	Basic	0.02	-	-	>4.90	<1.004	1.02
UGT1A4	Basic	0.02	-	-	>4.90	<1.004	1.02
UGT1A6	Basic	0.02	-	-	>8.53	<1.002	1.02
UGT1A9	Basic	0.02	-	-	1.29[i]	1.014	1.02
UGT2B4	Basic	0.02	-	-	>4.90	<1.004	1.02
UGT2B7	Basic	0.02	-	-	>4.90	<1.004	1.02

Notes: Molecular weight of vericiguat = 426.38 g/mol.
[a] FDA. (CDER) Jan. 2020
[b] Calculated $K_i = IC_{50}/2$ assuming competitive inhibition.
[c] Unbound K_i for CYP1A1 (0.92 µM; K_i = 1.45 µM; unbound fraction in 10 pmol/mL CYP1A1 = 0.637).
[d] The mechanistic static model for CYP1A1 inhibition assumed no enzyme inhibition in the gut.

[e] Unbound K_i (>9.88 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.05 mg/mL microsomes = 0.395).
[f] Unbound K_i (>4.90 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.196).
[g] Unbound K_i (>8.53 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.1 mg/mL microsomes = 0.341).
[h] Unbound K_i for CYP2J2 (> 9.88 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.22 pmol/mL CYP2J2 was not measured, but was assumed as the same in 0.05 mg/mL microsomes (0.395)).
[i] Unbound K_i (1.29 µM; K_i =6.6 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.196).
Abbreviations: FDA = Food and Drug Administration; DDI = drug-drug interaction; $[I]_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 10 mg vericiguat based on PopPK analysis [5.3.3.5.10 R-13341] 0.02 µM (vericiguat total I_{max} = 0.8 µM [350 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0218); $[I]_{in,max,u}$ = estimated unbound maximum plasma concentration at the inlet to the liver, 0.03 µM ($I_{in,max,u} = f_u \times (I_{max} + (F_a \times F_g \times K_a \times Dose)/Q_h/R_B)$, where fraction absorbed (F_a) =1, fraction escaping gut metabolism (F_g) =1, observed absorption rate constant (k_a) = 0.0212 min^{-1}, hepatic blood flow (Q_h) = 1617 mL/min, R_B (blood-to-plasma ratio) = 0.656; unbound fraction (f_u) = 0.0218); $[I]_{gut}$ = theoretical maximum gastrointestinal drug concentration, calculated as the highest clinical dose on a molar basis in a volume of 250 mL; K_i = inhibition constant; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; CYP = cytochrome P450; UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase.
Additional information: Unbound K_i value for each CYP or UGT isoform was calculated based on the unbound fraction in the incubations containing various concentrations of microsomal protein. The calculated $R_{1,gut}$ ($1+ [I_{gut}]/K_i$), if based on the K_i with testosterone as the probe substrate, was <12. However, it is noted that the percent inhibition of CYP3A4-mediated testosterone 6β-hydroxylation by vericiguat at the highest concentration tested (50 µM) was only ~13%. Thus, the calculated $R_{1,gut}$ could be well below the cut-off value of 11.

2.6.5.15- 13 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Enzyme Inhibition by Vericiguat (EMA)

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.4 PH-38684, 4.2.2.6.7 A57470

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between vericiguat and co-administered substrates of various enzymes, based on the EMA guidance (2012)[a]							
Enzyme	**Model**	**[I] (μM)**	**$[I]_h$ (μM)**	**$[I]_{gut}$ (μM)**	**K_i[b] (μM)**	**[I]/K_i**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
	Systemic						
CYP1A1	Basic	0.02	-	-	0.92[c]	0.019	0.02
CYP1A1	Mechanistic Static[d]	-	0.03	-	0.92	0.031	0.25
CYP1A2	Basic	0.02	-	-	>9.88[e]	<0.002	0.02
CYP2A6	Basic	0.02	-	-	>9.88	<0.002	0.02
CYP2B6	Basic	0.02	-	-	>4.90[f]	<0.004	0.02
CYP2C8	Basic	0.02	-	-	>9.88	<0.002	0.02
CYP2C9	Basic	0.02	-	-	>9.88	<0.002	0.02
CYP2C19	Basic	0.02	-	-	>4.90	<0.004	0.02
CYP2D6	Basic	0.02	-	-	>9.88	<0.002	0.02
CYP2E1	Basic	0.02	-	-	>8.53[g]	<0.002	0.02
CYP2J2	Basic	0.02	-	-	>9.88[h]	<0.002	0.02
CYP3A4/midazolam	Basic	0.02	-	-	>9.88	<0.002	0.02
CYP3A4/testosterone	Basic	0.02	-	-	>8.53	<0.002	0.02
	Intestinal						
CYP3A4/midazolam	Basic	-	-	94	>9.88	<10	10
CYP3A4/testosterone	Basic	-	-	94	>8.53	<11	10
	Systemic						
UGT1A1	Basic	0.02	-	-	>4.90	<0.004	0.02
UGT1A4	Basic	0.02	-	-	>4.90	<0.004	0.02
UGT1A6	Basic	0.02	-	-	>8.53	<0.002	0.02
UGT1A9	Basic	0.02	-	-	1.29[i]	0.014	0.02
UGT2B4	Basic	0.02	-	-	>4.90	<0.004	0.02
UGT2B7	Basic	0.02	-	-	>4.90	<0.004	0.02

Notes: Molecular weight of vericiguat = 426.38 g/mol.
[a] Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Guideline on the investigation of drug interactions. In: CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. London, England: European Medicines Agency; 2012.
[b] Calculated $K_i = IC_{50}/2$ assuming competitive inhibition.
[c] Unbound K_i for CYP1A1 (0.92 μM; K_i = 1.45 μM; unbound fraction in 10 pmol/mL CYP1A1 = 0.637).

[d] The mechanistic static model for CYP1A1 inhibition assumed no enzyme inhibition in the gut.
[e] Unbound K_i (>9.88 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.05 mg/mL microsomes = 0.395).
[f] Unbound K_i (>4.90 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.196).
[g] Unbound K_i (>8.53 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.1 mg/mL microsomes = 0.341).
[h] Unbound K_i for CYP2J2 (> 9.88 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.22 pmol/mL CYP2J2 was not measured, but was assumed as the same in 0.05 mg/mL microsomes (0.395)).
[i] Unbound K_i (1.29 µM; K_i =6.6 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.196).
Abbreviations: EMA = European Medicines Agency; DDI = drug-drug interaction; [I] = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 10 mg vericiguat based on PopPK analysis [5.3.3.5.10 R-13341] 0.02 µM (vericiguat total I_{max} = 0.8 µM [350 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0218); $[I]_h$ = maximal unbound inhibitor concentration in portal vein, 0.03 µM ($I_h = f_u$ x (I_{max} + ($F_a x F_g \times k_a \times$ Dose)/Q_h/R_B), where fraction absorbed (F_a) =1, fraction escaping gut metabolism (F_g) =1, observed absorption rate constant (k_a) = 0.0212 min^{-1}, hepatic blood flow (Q_h) = 1617 mL/min, R_B (blood-to-plasma ratio) = 0.656; unbound fraction (f_u) = 0.0218); $[I]_{gut}$ = theoretical maximum gastrointestinal drug concentration, calculated as the highest clinical dose on a molar basis in a volume of 250 mL; K_i = inhibition constant; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; CYP = cytochrome P450; UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase.
Additional information: Unbound K_i value for each CYP or UGT isoform was calculated based on the unbound fraction in the incubations containing various concentrations of microsomal protein. The calculated $[I]_{gut}/K_i$, if based on the K_i with testosterone as the probe substrate, was <11. However, it is noted that the percent inhibition of CYP3A4-mediated testosterone 6β-hydroxylation by vericiguat at the highest concentration tested (50 µM) was only ~13%. Thus, the calculated $[I]_{gut}/K_i$ could be well below the cut-off value of 10.

2.6.5.15- 14 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Enzyme Inhibition by M-1 (FDA)

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.5 PH-38683, 4.2.2.6.8 PH-38890

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between vericiguat (M-1 metabolite contribution) and co-administered substrates of various enzymes, based on the FDA guidance (2020)[a]					
Enzyme	**Model**	**$[I]_{max,u}$ (µM)**	**K_i[b] (µM)**	**$1+[I]/K_i$**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
Systemic[c]					
CYP1A1	Basic	0.04	4.57[d]	1.01	1.02
CYP1A2	Basic	0.04	>46.2[e]	<1.001	1.02
CYP2A6	Basic	0.04	>46.2	<1.001	1.02
CYP2B6	Basic	0.04	>44.1[f]	<1.001	1.02
CYP2C8	Basic	0.04	>46.2	<1.001	1.02
CYP2C9	Basic	0.04	>46.2	<1.001	1.02
CYP2C19	Basic	0.04	38.3[g]	1.001	1.02
CYP2D6	Basic	0.04	>46.2	<1.001	1.02
CYP2E1	Basic	0.04	>44.9[h]	<1.001	1.02
CYP2J2	Basic	0.04	>46.2[i]	<1.001	1.02
CYP3A4/midazolam	Basic	0.04	>46.2	<1.001	1.02
CYP3A4/testosterone	Basic	0.04	>44.9	<1.001	1.02
UGT1A1	Basic	0.04	>22.0[j]	<1.002	1.02
UGT1A4	Basic	0.04	>22.0	<1.002	1.02
UGT1A6	Basic	0.04	>23.1[k]	<1.002	1.02
UGT1A9	Basic	0.04	>22.4[l]	<1.002	1.02
UGT2B4	Basic	0.04	>22.0	<1.002	1.02
UGT2B7	Basic	0.04	>22.4	<1.002	1.02

Notes: Molecular weight of M-1 = 602.50 g/mol.
[a] FDA. (CDER) Jan. 2020
[b] Calculated $K_i = IC_{50}/2$ assuming competitive inhibition.
[c] M-1 was not dosed orally; therefore, only systemic DDIs are assessed.
[d] Unbound K_i for CYP1A1 (4.57 µM; K_i = 4.95 µM; unbound fraction in 10 pmol/mL CYP1A1was not measured, but was assumed as the same in 0.05 mg/mL microsomes (0.924)).
[e] Unbound K_i (>46.2 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.05 mg/mL microsomes = 0.924).
[f] Unbound K_i (>44.1 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.881).
[g] Unbound K_i (38.3 µM; K_i = 43.5 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.881).
[h] Unbound K_i (>44.9 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.1 mg/mL microsomes = 0.897).
[i] Unbound K_i for CYP2J2 (> 46.2 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.22 pmol/mL CYP2J2 was not measured, but was assumed as the same in 0.05 mg/mL microsomes (0.924)).

[h] Unbound K_i (>22.0 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.881).
[k] Unbound K_i (>23.1 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.05 mg/mL microsomes = 0.924).
[l] Unbound K_i (>22.4 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.1 mg/mL microsomes = 0.897).
Abbreviations: FDA = Food and Drug Administration; DDI = drug-drug interaction; $[I]_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration of M-1 in humans treated with 10 mg vericiguat based on PBPK analysis [5.3.3.5.7 PH-41143] 0.04 µM (M-1 total I_{max} = 2.7 µM [1610 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0163); K_i = inhibition constant; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; CYP = cytochrome P450; UGT = uridine diphosphate glucuronosyltransferase.
Additional information: Unbound K_i value for each CYP or UGT isoform was calculated based on the unbound fraction in the incubations containing various concentrations of microsomal protein.

2.6.5.15- 15 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Enzyme Inhibition by M-1 (EMA)

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.5 PH-38683, 4.2.2.6.8 PH-38890

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between vericiguat (M-1 metabolite contribution) and co-administered substrates of various enzymes, based on the EMA guidance (2012)[a]					
Enzyme	**Model**	**[I] (µM)**	**K_i[b] (µM)**	**[I]/K_i**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
Systemic[c]					
CYP1A1	Basic	0.04	4.57[d]	0.01	0.02
CYP1A2	Basic	0.04	>46.2[e]	<0.001	0.02
CYP2A6	Basic	0.04	>46.2	<0.001	0.02
CYP2B6	Basic	0.04	>44.1[f]	<0.001	0.02
CYP2C8	Basic	0.04	>46.2	<0.001	0.02
CYP2C9	Basic	0.04	>46.2	<0.001	0.02
CYP2C19	Basic	0.04	38.3[g]	0.001	0.02
CYP2D6	Basic	0.04	>46.2	<0.001	0.02
CYP2E1	Basic	0.04	>44.9[h]	<0.001	0.02
CYP2J2	Basic	0.04	>46.2[i]	<0.001	0.02
CYP3A4/midazolam	Basic	0.04	>46.2	<0.001	0.02
CYP3A4/testosterone	Basic	0.04	>44.9	<0.001	0.02
UGT1A1	Basic	0.04	>22.0[j]	<0.002	0.02
UGT1A4	Basic	0.04	>22.0	<0.002	0.02
UGT1A6	Basic	0.04	>23.1[k]	<0.002	0.02
UGT1A9	Basic	0.04	>22.4[l]	<0.002	0.02
UGT2B4	Basic	0.04	>22.0	<0.002	0.02
UGT2B7	Basic	0.04	>22.4	<0.002	0.02

Notes: Molecular weight of M-1 = 602.50 g/mol.
[a] Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Guideline on the investigation of drug interactions. In: CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. London, England: European Medicines Agency; 2012.
[b] Calculated $K_i = IC_{50}/2$ assuming competitive inhibition.
[c] M-1 was not dosed orally; therefore, only systemic DDIs are assessed.
[d] Unbound K_i for CYP1A1 (4.57 µM; K_i = 4.95 µM; unbound fraction in 10 pmol/mL CYP1A1 was not measured, but was assumed the same as in 0.05 mg/mL microsomes (0.924)).
[e] Unbound K_i (>46.2 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.05 mg/mL microsomes = 0.924).
[f] Unbound K_i (>44.1 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.881).
[g] Unbound K_i (38.3 µM; K_i = 43.5 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.881).
[h] Unbound K_i (>44.9 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.1 mg/mL microsomes = 0.897).

[i] Unbound K_i for CYP2J2 (> 46.2 µM; K_i > 50 µM; unbound fraction in 0.22 pmol/mL CYP2J2 was not measured, but was assumed as the same in 0.05 mg/mL microsomes (0.924)).
[j] Unbound K_i (>22.0 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.5 mg/mL microsomes = 0.881).
[k] Unbound K_i (>23.1 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.05 mg/mL microsomes = 0.924).
[l] Unbound K_i (>22.4 µM; K_i > 25 µM; unbound fraction in 0.1 mg/mL microsomes = 0.897).
Abbreviations: EMA = European Medicines Agency; DDI = drug-drug interaction; [I] = unbound maximum plasma concentration of M-1 in humans treated with 10 mg vericiguat based on PBPK analysis [5.3.3.5.7 PH-41143] 0.04 µM (M-1 total I_{max} = 2.7 µM [1610 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0163); K_i = inhibition constant; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; CYP = cytochrome P450; UGT = Uridine diphosphate glucuronosyltransferase.
Additional information: Unbound K_i value for each CYP or UGT isoform was calculated based on the unbound fraction in the incubations containing various concentrations of microsomal protein.

2.6.5.15- 16 Pharmacokinetics: Induction of Human CYP1A2, 2B6, and 3A4 by Vericiguat

CYP1A2

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.9 PH-39549

Type of Study:		CYP1A2 Induction					
Methods:		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with vericiguat (0.005 to10 µg/mL), or the positive control inducer omeprazole (0.023 to 50 µg/mL) for 72 h.					
Analytical Methods		mRNA quantitation by real time PCR and enzyme activity by LC-MS/MS					
Donor ID:		Donor 1[a]		Donor 2[a]		Donor 3[a]	
Treatment	**µg/mL**	**CYP1A2 mRNA**	**Phenacetin-*O*-dealkylation**	**CYP1A2 mRNA**	**Phenacetin-*O*-dealkylation**	**CYP1A2 mRNA**	**Phenacetin-*O*-dealkylation**
		Fold[b]	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**
Omeprazole	16.7/50[d]	8.6	10.2	13.6	10.9	6.7	11.5
Vericiguat	0.005	1.1	0.9	1.1	1.0	1.0	0.9
	0.014	1.1	0.9	1.0	1.1	1.2	0.9
	0.041	1.0	0.8	1.0	0.9	1.0	0.9
	0.123	1.1	0.8	1.1	0.8	1.3	0.9
	0.370	1.2	0.8	1.1	1.0	1.3	1.0
	1.1	1.4	1.0	1.4	0.9	1.2	1.1
	3.3	1.5	1.0	1.5	1.2	1.5	1.4
	10	1.9	1.2	1.9	1.4	1.7	1.7
Vehicle Control	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[a] When the maximal fold induction (E_{max}) value was below two-fold, the concentration at which there is a 50% maximal induction effect (EC_{50}) was not calculated.

[b] Fold change values are relative to vehicle control, normalized to β-actin/β-tubulin.

[c] Fold change: activity of test article treated cells / activity of vehicle control.

[d] Omeprazole concentration of 16.7 µg/mL for Donor 1 and Donor 3. Omeprazole concentration of 50 µg/mL for mRNA and 16.7 µg/mL for activity for Donor 2.

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.

Additional Information: Molecular weight of vericiguat = 426.38 g/mol; 10 µg/mL = 23.5 µM. Vericiguat at the concentrations tested is not an inducer of CYP1A2.

CYP2B6

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.9 PH-39549

Type of Study:		CYP2B6 Induction					
Methods:		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with vericiguat (0.005 to 10 µg/mL), or the positive control inducers rifampicin (0.014 to 30 µg/mL) and phenobarbital (0.457 to 1000 µg/mL) for 72 h, respectively.					
Analytical Methods:		mRNA quantitation by real time PCR and enzyme activity by LC-MS/MS					
Donor ID:		Donor 1		Donor 2[a]		Donor 3[a]	
Treatment	**µg/mL**	**CYP2B6 mRNA**	***S*-mephenytoin *N*-demethylation**	**CYP2B6 mRNA**	***S*-mephenytoin *N*-demethylation**	**CYP2B6 mRNA**	***S*-mephenytoin *N*-demethylation**
		Fold[b]	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**
Rifampicin	10	4.4	3.7	6.2	4.1	5.7	5.5
Phenobarbital	125	5.8	3.6	8.9	4.7	5.0	4.6
Vericiguat	0.005	0.9	0.9	0.7	1.0	1.1	0.9
	0.014	1.1	0.9	0.8	1.1	1.1	1.0
	0.041	1.0	0.9	0.7	1.0	0.9	1.0
	0.123	1.1	0.9	0.7	1.0	1.1	0.9
	0.370	1.3	0.9	0.8	1.0	1.1	0.9
	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9
	3.3	1.5	0.9	1.1	1.1	1.3	1.0
	10	2.3	1.2	1.8	1.2	1.6	1.2
Vehicle Control	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[a] When the maximal fold induction (E_{max}) value was below two-fold, the concentration at which there is a 50% maximal induction effect (EC_{50}) was not calculated.

[b] Fold change values are relative to vehicle control, normalized to β-actin/β-tubulin.

[c] Fold change: activity of test article treated cells / activity of vehicle control.

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.

Additional Information: Molecular weight of vericiguat = 426.38 g/mol; 10 µg/mL = 23.5 µM. Vericiguat at the concentrations tested is not an inducer of CYP2B6.

CYP3A4

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.9 PH-39549

Type of Study:		CYP3A4 Induction					
Methods:		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with vericiguat (0.005 to 10 µg/mL), or the positive control inducers rifampicin (0.014 to 30 µg/mL) and phenobarbital (0.457 to 1000 µg/mL) for 72 h, respectively.					
Analytical Methods:		mRNA quantitation by real time PCR and enzyme activity by LC-MS/MS					
Donor ID:		Donor 1[a]		Donor 2[a]		Donor 3	
Treatment	**µg/mL**	**CYP3A4 mRNA**	**Testosterone-6β-hydroxylation**	**CYP3A4 mRNA**	**Testosterone-6β-hydroxylation**	**CYP3A4 mRNA**	**Testosterone-6β-hydroxylation**
		Fold[b]	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**
Rifampicin	10	11.5	8.3	10.3	9.8	38.8	16.3
Phenobarbital	125	13.8	5.8	9.6	8.4	43.4	14.2
Vericiguat	0.005	1.0	0.7	1.2	0.9	0.7	0.9
	0.014	1.0	0.8	1.4	1.2	1.0	0.9
	0.041	1.1	0.8	1.3	0.8	0.9	0.8
	0.123	1.0	0.7	1.0	0.8	1.2	0.8
	0.370	1.6	0.8	0.7	0.9	1.3	0.9
	1.1	1.4	0.9	1.2	0.8	0.9	1.0
	3.3	1.9	0.9	1.5	1.1	1.4	1.2
	10	1.8	0.9	1.9	1.2	2.7	1.4
Vehicle Control	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[a] When the maximal fold induction (E_{max}) value was below two-fold, the concentration at which there is a 50% maximal induction effect (EC_{50}) was not calculated.
[b] Fold change values are relative to vehicle control, normalized to β-actin/β-tubulin.
[c] Fold change: activity of test article treated cells / activity of vehicle control.
Abbreviations: CYP = cytochrome P450; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.
Additional Information: Molecular weight of vericiguat = 426.38 g/mol; 10 µg/mL = 23.5 µM. Induction of CYP3A4 mRNA was observed in one of the three donors tested (Donor 3), with maximal induction of 2.7-fold (4% of positive control rifampicin response) at 10 µM. The potential risk for CYP3A4 induction was further assessed using the RIS method. The in vitro induction data in human hepatocytes (CYP3A4 mRNA data) and the clinical exposure data from multiple oral dose administration of 10 mg vericiguat QD (total C_{max} ~1 µM and unbound C_{max} ~ 0.02 µM) were used as input data. The RIS model predicted a 15% decrease in midazolam AUC, indicating that vericiguat is likely not an inducer of CYP3A4 in vivo.

2.6.5.15- 17 Pharmacokinetics: Induction of Human CYP1A2, 2B6, and 3A4 by M-1

CYP1A2

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.9 PH-39549

Type of Study:		CYP1A2 Induction					
Methods:		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with M-1 (0.041 to 90 µg/mL), or the positive control inducer omeprazole (0.023 to 50 µg/mL) for 72 h.					
Analytical Methods:		mRNA quantitation by real time PCR and enzyme activity by LC-MS/MS					
Donor ID:		Donor 1[a]		Donor 2[a]		Donor 3[a]	
Treatment	**µg/mL**	**CYP1A2 mRNA**	**Phenacetin-*O*-dealkylation**	**CYP1A2 mRNA**	**Phenacetin-*O*-dealkylation**	**CYP1A2 mRNA**	**Phenacetin-*O*-dealkylation**
		Fold[b]	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**
Omeprazole	16.7/50[d]	8.6	10.2	13.6	10.9	6.7	11.5
M-1	0.041	1.2	1.2	1.3	1.3	1.3	1.1
	0.123	1.1	1.3	1.1	1.5	1.0	1.1
	0.370	1.1	1.2	1.1	1.3	1.2	1.1
	1.1	1.1	1.1	1.3	1.2	1.1	1.1
	3.3	1.3	1.2	1.1	1.3	1.2	1.2
	10	1.6	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2
	30	1.3	1.5	1.4	1.5	1.4	1.4
	90	1.5	1.7	1.7	1.6	2.0	1.5
Vehicle Control	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[a] When the maximal fold induction (E_{max}) value was below two-fold, the concentration at which there is a 50% maximal induction effect (EC_{50}) was not calculated.

[b] Fold change values are relative to vehicle control, normalized to β-actin/β-tubulin.

[c] Fold change: activity of test article treated cells / activity of vehicle control.

[d] Omeprazole concentration of 16.7 µg/mL for Donor 1 and Donor 3. Omeprazole concentration of 50 µg/mL for mRNA and 16.7 µg/mL for activity for Donor 2.

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.

Additional Information: Molecular weight of M-1 = 602.50 g/mol; 90 µg/mL = 150 µM. M-1 at the concentrations tested is not an inducer of CYP1A2.

CYP2B6

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.9 PH-39549

Type of Study:		CYP2B6 Induction					
Methods:		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with M-1 (0.041 to 90 µg/mL), or the positive control inducers rifampicin (0.014 to 30 µg/mL) and phenobarbital (0.457 to 1000 µg/mL) for 72 h, respectively.					
Analytical Methods:		mRNA quantitation by real time PCR and enzyme activity by LC-MS/MS					
Donor ID:		Donor 1[a]		Donor 2[a]		Donor 3[a]	
Treatment	**µg/mL**	**CYP2B6 mRNA**	***S*-mephenytoin *N*-demethylation**	**CYP2B6 mRNA**	***S*-mephenytoin *N*-demethylation**	**CYP2B6 mRNA**	***S*-mephenytoin *N*-demethylation**
		Fold[b]	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**
Rifampicin	10	4.4	3.7	6.2	4.1	5.7	5.5
Phenobarbital	125	5.8	3.6	8.9	4.7	5.0	4.6
M-1	0.041	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.1
	0.123	1.1	1.2	1.1	1.4	0.8	1.2
	0.370	1.0	1.0	1.0	1.2	0.9	1.1
	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.2
	3.3	1.1	1.1	1.1	1.1	0.9	1.2
	10	1.1	1.1	1.2	1.2	1.0	1.3
	30	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1
	90	1.3	1.1	1.3	1.1	1.3	1.2
Vehicle Control	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[a] When the maximal fold induction (E_{max}) value was below two-fold, the concentration at which there is a 50% maximal induction effect (EC_{50}) was not calculated.

[b] Fold change values are relative to vehicle control, normalized to β-actin/β-tubulin.

[c] Fold change: activity of test article treated cells/activity of vehicle control.

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.

Additional Information: Molecular weight of M-1 = 602.50 g/mol; 90 µg/mL = 150 µM. M-1 at the concentrations tested is not an inducer of CYP2B6.

CYP3A4

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.9 PH-39549

Type of Study:		CYP3A4 Induction					
Methods:		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with M-1 (0.041 to 90 µg/mL), or the positive control inducers rifampicin (0.014 to 30 µg/mL) and phenobarbital (0.457 to 1000 µg/mL) for 72 h, respectively.					
Tabulated Results:		mRNA quantitation by real time PCR and enzyme activity by LC-MS/MS					
Donor ID:		Donor 1[a]		Donor 2[a]		Donor 3[a]	
Treatment	**µg/mL**	**CYP3A4 mRNA**	**Testosterone-6β-hydroxylation**	**CYP3A4 mRNA**	**Testosterone-6β-hydroxylation**	**CYP3A4 mRNA**	**Testosterone-6β-hydroxylation**
		Fold[b]	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**	**Fold[b]**	**Fold[c]**
Rifampicin	10	11.5	8.3	10.3	9.8	38.8	16.3
Phenobarbital	125	13.8	5.8	9.6	8.4	43.4	14.2
M-1	0.041	1.0	1.1	1.5	1.4	1.3	1.2
	0.123	1.1	1.2	1.5	1.5	1.2	1.3
	0.370	1.1	1.2	1.2	1.4	1.2	1.2
	1.1	1.1	1.0	1.4	1.3	1.3	1.2
	3.3	1.2	1.2	1.4	1.5	1.3	1.3
	10	1.5	1.2	1.7	1.4	1.5	1.3
	30	1.3	1.3	1.4	1.6	1.5	1.3
	90	1.1	1.3	1.8	1.5	2.1	1.4
Vehicle Control	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

[a] When the maximal fold induction (E_{max}) value was below two-fold, the concentration at which there is a 50% maximal induction effect (EC_{50}) was not calculated.
[b] Fold change values are relative to vehicle control, normalized to β-actin/β-tubulin.
[c] Fold change: activity of test article treated cells / activity of vehicle control.
Abbreviations: CYP = cytochrome P450; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry.
Additional Information: Molecular weight of M-1 = 602.50 g/mol; 90 µg/mL = 150 µM. M-1 at the concentrations tested is not an inducer of CYP3A4.

2.6.5.15- 18 Pharmacokinetics: In Vitro Cell Permeability of Vericiguat Across Caco-2 Cell Monolayers

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.10 PH-39500

Type of Study:	Permeability					
Methods:	In vitro permeability of vericiguat across Caco-2 cell monolayers.					
Analytical Method:	LC-MS/MS					
Compound	**Concentration (µM)**	**Caco-2 (P_{app} A-B)**		**Caco-2 (P_{app} B-A)**		**Efflux Ratio**
		Mean [nm/s]	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**
Vericiguat	2	111	22	464	36.8	4.21
Sulfasalazine	10	0.55	0.1	242	20.8	440.5
Atenolol	10	5.3	0.4	14.3	1.5	2.71

Abbreviations: P_{app} = apparent permeability; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; SD = standard deviation (n=3).
Additional Information: The P_{app} value for vericiguat of 111±22 nm/s at 2 µM was in the range of the historical values determined for fluvastatin, which is reported to be highly permeable. Therefore, vericiguat was classified as a highly permeable compound. It is noted that the P_{app} values for the two internal controls (sulfasalazine and atenolol) were in line with the historical data, thus confirming the functionality of the system.

2.6.5.15- 19 Pharmacokinetics: In Vitro Cell Permeability of M-1 Across Caco-2 Cell Monolayers

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.11 PH-40308

Type of Study:	Permeability					
Methods:	In vitro permeability of M-1 across Caco-2 cell monolayers.					
Analytical Method:	LC-MS/MS					
Compound	**Concentration (µM)**	**Caco-2 (P_{app} A-B)**		**Caco-2 (P_{app} B-A)**		**Efflux Ratio**
		Mean [nm/s]	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**
M-1	2	1.3[a]	0.2	1.3	0.1	0.98
	20	1.1	0.2	1.0	0.3	0.92
Sulfasalazine	10	1.4[a]	0.2	266	31.0	189
Atenolol	10	9.9	0.7	13.5	1.0	1.36

[a] Concentrations in the basal receiver compartment were slightly below the Lower Limit of Quantification and the back calculated values were used. Therefore, resulting values should be regarded as estimates.
Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; P_{app} = apparent permeability; SD = standard deviation (n=3).
Additional Information: The P_{app} value for M-1 of 1.3±0.2 nm/s and 1.1±0.2 nm/s at 2 and 20 µM were as low as the two controls, sulfasalazine and atenolol. Both controls are reported to be lowly permeable. Therefore, M-1 was classified as lowly permeable. It is noted that the P_{app} values for the two internal controls (sulfasalazine and atenolol) were in line with the historical data, thus confirming the functionality of the system.

2.6.5.15- 20 Pharmacokinetics: Evaluation of Vericiguat as a Substrate of Human P-gp

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.12 PH-39110

Type of Study:	Transporter phenotyping													
Methods:	Bi-directional transport of vericiguat across LLC-PK1 and L-MDR1 (P-gp) cells.													
Analytical Method:	LC-MS/MS													
Compound	**Conc. (µM)**	**Inhibitor (Concentration)**	**LLC-PK1 P_{app} A-B**		**LLC-PK1 P_{app} B-A**		**LLC-PK1 Efflux Ratio**		**L-MDR1 P_{app} A-B**		**L-MDR1 P_{app} B-A**		**L-MDR1 Efflux Ratio**	
			Mean [nm/s]	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**
Vericiguat	0.1	-	80.2	2.8	163.1	8.9	2.0	0.10	75.2	1.8	233.8	13.7	3.1	0.23
	1	-	77.7	2.6	171.1	2.7	2.2	0.10	31.7	2.8	218.5	5.1	6.9	0.63
	1	Ivermectin (5 µM)	114.6	6.4	118.1	9.3	1.0	0.10	106.2	6.9	133.8	11.5	1.3	0.08
	3	-	89.7	4.0	174.8	9.3	2.0	0.10	32.9	2.3	221.4	13.5	6.7	0.60
	10	-	20.2	2.2	111.0	10.6	5.5	1.10	34.0	3.2	213.5	10.6	6.3	0.70
	100	-	65.5	1.8	54.2	11.7	0.8	0.20	102.7	10.2	147.2	12.4	1.4	0.21
Dipyridamole	2	-	102.0	2.6	197.9	7.8	1.9	0.08	9.5	1.5	403.7	41.2	42.4	8.12
	2	Ivermectin (5 µM)	190.9	19.2	199.4	8.3	1.0	0.10	141.7	13.4	350.4	22.9	2.5	0.33

Abbreviations: LLC-PK1 = LLC-PK1 = Lewis lung carcinoma pork kidney cell line; L-MDR1 = multidrug resistance protein 1 (human P-gp)-transfected LLC-PK1 cells; P-gp = P-glycoprotein; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; P_{app} = apparent permeability; SD = standard deviation (n = 3).
Additional Information: Directional transport was observed in L-MDR1 cells and can be inhibited by ivermectin (P-gp inhibitor), indicating that vericiguat is a P-gp substrate. The mass transfer of Lucifer Yellow from the donor to the receiver compartment was <2%, confirming integrity of the cell monolayer used in the study.

2.6.5.15- 21 Pharmacokinetics: Evaluation of M-1 as a Substrate of Human P-gp

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.13 PH-39547

Type of Study:	Transporter phenotyping													
Methods:	Bi-directional transport of M-1 in LLC-PK1 and L-MDR1 (P-gp) cells.													
Analytical Method:	LC-MS/MS													
Compound	**Conc. (µM)**	**Inhibitor (Concentration)**	**LLC-PK1 P_{app} A-B**		**LLC-PK1 P_{app} B-A**		**LLC-PK1 Efflux Ratio**		**L-MDR1 P_{app} A-B**		**L-MDR1 P_{app} B-A**		**L-MDR1 Efflux Ratio**	
			Mean [nm/s]	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**
M-1	1	-	26.7	1.3	22.7	0.4	0.9	0.04	5.3	0.4	9.8	0.7	1.9	0.19
	10	-	22.8	1.4	24.7	3.8	1.1	0.18	5.6	0.6	9.7	1.0	1.7	0.26
	50	-	23.6	0.3	25.8	1.2	1.1	0.05	7.6	0.6	10.7	1.7	1.4	0.25
Dipyridamole	2	-	151.6	13.3	184.8	7.0	1.2	0.12	15.7	0.3	755.9	40.1	48.2	2.68
	2	Ivermectin (5 µM)	276.0	2.4	135.2	7.7	0.5	0.03	163.9	6.8	469.3	11.0	2.9	0.14

Abbreviations: LLC-PK1 = LLC-PK1 = Lewis lung carcinoma pork kidney cell line; L-MDR1 = multidrug resistance protein 1 (human P-gp)-transfected LLC-PK1 cells; P-gp = P-glycoprotein; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; P_{app} = apparent permeability; SD = standard deviation (n=3).
Additional Information: No directional transport was observed in L-MDR1 cells, indicating that M-1 is not a P-gp substrate at the condition tested. In contrast, directional transport was observed for dipyridamole (a probe substrate of P-gp) with an efflux ratio of 48, and the ratio was reduced to 2.9 in the presence of a P-gp inhibitor (ivermectin), confirming the functionality of the expression system for P-gp. The mass transfer of Lucifer Yellow from the donor to the receiver compartment was <4%, confirming integrity of the cell monolayer used in the study.

2.6.5.15- 22 Pharmacokinetics: Evaluation of Vericiguat as a Substrate of Human BCRP

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.14 PH-39113

Type of Study:	Transporter phenotyping													
Methods:	Bi-directional transport of vericiguat in MDCKII and BCRP cells.													
Analytical Method:	LC-MS/MS													
Compound	**Conc. (µM)**	**Inhibitor (Concentration)**	**MDCKII-WT P_{app} A-B**		**MDCKII-WT P_{app} B-A**		**MDCKII-WT Efflux Ratio**		**MDCKII-BCRP P_{app} A-B**		**MDCKII-BCRP P_{app} B-A**		**MDCKII-BCRP Efflux Ratio**	
			Mean [nm/s]	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**
Vericiguat	0.2	-	87.2	5.1	189.3	5.5	2.2	0.1	30.1	5.2	393.6	19.4	13.1	2.3
	2	-	91.3	2.5	188.7	6.5	2.1	0.1	33.9	3.9	365.0	10.9	10.8	1.3
	2	Ko143 (1 µM)	94.9	4.7	233.1	4.5	2.5	0.1	193.8	20.3	137.5	2.7	0.7	0.1
	20	-	85.2	4.2	232.2	5.3	2.7	0.1	48.4	7.7	321.4	19.9	6.6	1.1
Topotecan	2	-	18.16	1.6	73.72	0.8	4.06	0.4	6.7	0.8	129.5	2.4	19.2	2.4
	2	Ko143 (1 µM)	24.56	0.6	98.28	1.6	4	0.1	41.9	6.8	38.6	0.5	0.9	0.2

Abbreviations: MDCKII = Madin Darby canine kidney cell line II; BCRP = breast cancer resistance protein; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; WT = wild type; P_{app} = apparent permeability; SD = standard deviation (n=3); Ko143 = tert-butyl 3-[(3S,6S,12aS)-9-methoxy-6-(2-methylpropyl)-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,12,12a-octahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indol-3yl]propanoate.
Additional Information: Directional transport was observed in MDCKII-BCRP cells and can be inhibited by Ko143 (BCRP inhibitor), indicating that vericiguat is a BCRP substrate.

2.6.5.15- 23 Pharmacokinetics: Evaluation of M-1 as a Substrate of Human BCRP

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.15 PH-39548

Type of Study:	Transporter phenotyping													
Methods:	Bi-directional transport of M-1 in MDCKII and BCRP cells.													
Analytical Methods:	LC-MS/MS													
Compound	**Conc. (µM)**	**Inhibitor (Concentration)**	**MDCKII-WT P_{app} A-B**		**MDCKII-WT P_{app} B-A**		**MDCKII-WT Efflux Ratio**		**MDCKII-BCRP P_{app} A-B**		**MDCKII-BCRP P_{app} B-A**		**MDCKII-BCRP Efflux Ratio**	
			Mean [nm/s]	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean [nm/s]**	**SD [nm/s]**	**Mean**	**SD**
M-1	1	-	3.1	0.1	10.3	0.2	3.3	0.2	2.8	0.3	5.4	0.3	1.9	0.2
	10	-	3.6	0.1	8.3	0.9	2.3	0.3	2.8	0.2	4.5	0.5	1.6	0.2
	50	-	4.0	0.4	13.9	0.4	3.5	0.4	2.4	0.0	5.3	0.4	2.2	0.2
Topotecan	2	-	20.3	1.1	64.4	1.0	3.2	0.2	5.8	0.4	144.4	5.5	24.8	1.9
	2	Ko143 (1 µM)	20.5	0.7	68.3	3.2	3.3	0.2	25.6	0.4	29.3	3.1	1.1	0.1

Abbreviations: MDCKII = Madin Darby canine kidney cell line II; BCRP = breast cancer resistance protein; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; WT = wild type; P_{app} = apparent permeability; SD = standard deviation (n=3); Ko143 = tert-butyl 3-[(3S,6S,12aS)-9-methoxy-6-(2-methylpropyl)-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,12,12a-octahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indol-3yl]propanoate.

Additional Information: In MDCKII-BCRP cells, M-1 showed an efflux ratio of less than 2 at 1 and 10 µM (1.9 and 1.6, respectively), and slightly greater than 2 at 50 µM (2.2). It is noted that the efflux ratio of M-1 at 50 µM in MDCKII-WT control cells was also greater than 2 (3.5). Thus, the MDCKII-BCRP/MDCKII-WT ratio is <2, indicating that M-1 is not a BCRP substrate. In contrast, directional transport was observed with topotecan (a probe substrate of BCRP) with an efflux ratio of 25, and the efflux ratio was reduced to 1.1 in the presence of a BCRP inhibitor (Ko143), confirming the functionality of the expression system for BCRP.

2.6.5.15- 24 Pharmacokinetics: Evaluation of Vericiguat as a Substrate of Human Uptake Transporters OATP1B1, OATP1B3, and OCT1

OATP1B1

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.16 R-9572

Type of Study:	Transporter phenotyping
Methods:	In vitro uptake of [^{14}C]vericiguat in HEK293 cells stably transfected with OATP1B1 transporter.
Analytical Method:	Liquid scintillation counting

Substrate	Inhibitor	Time (min)	HEK293 cells (pmol/mg/5 min)		HEK293-OATP1B1 cells (pmol/mg/5 min)		Uptake Ratio[a]
			Mean	Av. Dev.	Mean	Av. Dev.	
[^{14}C]Vericiguat (0.5 µM)	-	5	28	1	30	0.1	1.1
	ES (10 µM)	5	28	1	30	1	1.1
	Rifampicin (50 µM)	5	30	1	31	1	1.0
[^{14}C]Vericiguat (5 µM)	-	5	228	49	242	54	1.1
	ES (10 µM)	5	240	65	253	68	1.1
	Rifampicin (50 µM)	5	229	33	235	37	1.0
[^{3}H]ES (0.03 µM)	-	1	0.028[b]	0.002[b]	1.194[b]	0.01[b]	43
	Rifampicin (50 µM)	1	0.027[b]	0.001[b]	0.256[b]	0.00[b]	9.5

[a] Calculated as the ratio of uptake rate in HEK293-OATP1B1 cells over that in HEK293 cells.

[b] Unit for these values: pmol/mg/min.

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; Av. Dev. = average deviation; ES = estrone sulfate.

Additional Information: No active uptake mediated by OATP1B1 was observed for vericiguat at concentrations of 0.5 and 5 µM, indicating that vericiguat is not a substrate for OATP1B1. In contrast, uptake was observed for estrone 3-sulfate (a probe substrate of OATP1B1) with an uptake ratio of 43, and the ratio was reduced to 9.5 in the presence of an OATP1B1/3 inhibitor (rifampicin), confirming the functionality of the expression system for OATP1B1.

OATP1B3

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.16 R-9572

Type of Study:	Transporter phenotyping						
Methods:	In vitro uptake of [^{14}C]vericiguat in HEK293 cells stably transfected with OATP1B3 transporter.						
Analytical Method:	Liquid scintillation counting						
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**HEK293 cells (pmol/mg/10 min)**		**HEK293-OATP1B3 cells (pmol/mg/10 min)**		**Uptake Ratio[a]**
			Mean	**Av. Dev.**	**Mean**	**Av. Dev.**	
[^{14}C]Vericiguat (0.5 µM)	-	10	31	1	33	0.1	1.1
	BSP (10 µM)	10	33	2	34	1	1.0
	Rifampicin (5 µM)	10	34	1	35	0.01	1.0
[^{14}C]Vericiguat (5 µM)	-	10	274	36	283	33	1.0
	BSP (10 µM)	10	292	78	301	78	1.0
	Rifampicin (5 µM)	10	285	58	294	58	1.0
[^{3}H]BSP (0.05 µM)	-	7	0.32[b]	0.05[b]	1.30[b]	0.020[b]	4.1
	Rifampicin (5 µM)	7	0.33[b]	0.02[b]	0.43[b]	0.041[b]	1.3

[a] Calculated as the ratio of uptake rate in HEK293-OATP1B3 cells over that in HEK293 cells.

[b] Unit for these values: pmol/mg/min.

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; Av. Dev. = average deviation; BSP = sulfobromophthalein.

Additional Information**:** No active uptake mediated by OATP1B3 was observed for vericiguat at concentrations of 0.5 and 5 µM, indicating that vericiguat is not a substrate for OATP1B3. In contrast, uptake was observed with sulfobromophthalein (a probe substrate of OATP1B3) with an uptake ratio of 4.1, and the ratio was reduced to 1.3 in the presence of an OATP1B1/3 inhibitor (rifampicin), confirming the functionality of the expression system for OATP1B3.

OCT1

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.18 R-9971

Type of Study:	Transporter phenotyping						
Methods:	In vitro uptake of [^{14}C]vericiguat in HEK293 cells stably transfected with OCT1 transporter.						
Analytical Method:	Liquid scintillation counting						
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**HEK293 cells (pmol/mg)**		**HEK293-OCT1 cells (pmol/mg)**		**Uptake Ratio[a]**
			Mean	**Av. Dev.**	**Mean**	**Av. Dev.**	
[^{14}C]Vericiguat (0.5 µM)	-	1	17	0	15	1	0.88
	Decynium 22 (50 µM)	1	16	1	13	0	0.81
	-	5	31	1	28	2	0.90
[^{14}C]Vericiguat (5 µM)	-	1	146	5	124	4	0.85
	Decynium 22 (50 µM)	1	152	12	124	5	0.81
	-	5	304	14	288	7	0.95
[^{3}H]MPP (10 µM)	-	1	41	4	464	29	11.3
	Decynium 22 (50 µM)	1	19	0	75	4	3.9

[a] Calculated as the ratio of uptake rate in HEK293-OCT1 cells over that in HEK293 cells.
Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OCT1 = organic cation transporter 1; Av. Dev. = average deviation; MPP = 1-methyl-4-phenylpyridinium.
Additional Information: No active uptake mediated by OCT1 was observed for vericiguat at concentrations of 0.5 and 5 µM, indicating that vericiguat is not a substrate for OCT1. In contrast, uptake was observed with 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP, a probe substrate of OCT1), with an uptake ratio of 11, and the ratio was reduced to 3.9, in the presence of an OCT1 inhibitor (decynium22), confirming the functionality of the expression system for OCT1.

2.6.5.15- 25 Pharmacokinetics: Evaluation of M-1 as a Substrate of Human Uptake Transporters OATP1B1 and OATP1B3

OATP1B1

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.17 R-9571

Type of Study:	Transporter phenotyping						
Methods:	In vitro uptake of [^{3}H]M-1 in HEK293 cells stably transfected with OATP1B1 transporter.						
Analytical Method:	Liquid scintillation counting						
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**HEK293 cells (pmol/mg/5 min)**		**HEK293-OATP1B1 cells (pmol/mg/5 min)**		**Uptake Ratio[a]**
			Mean	**Av. Dev.**	**Mean**	**Av. Dev.**	
[^{3}H]M-1 (0.2 µM)	-	5	0.72	0.10	1.0	0.11	1.4
	ES (10 µM)	5	0.73	0.06	0.81	0.09	1.1
	Rifampicin (50 µM)	5	0.77	0.10	0.83	0.15	1.1
[^{3}H]M-1 (2 µM)	-	5	6.75	0.53	8.50	1.16	1.3
	ES (10 µM)	5	7.04	1.30	7.92	0.88	1.1
	Rifampicin (50 µM)	5	7.35	0.49	7.19	0.19	1.0
[^{3}H]ES (0.03 µM)	-	1	0.049[b]	0.02[b]	1.27[b]	0.04[b]	25.9
	Rifampicin (50 µM)	1	0.037[b]	0.005[b]	0.256[b]	0.02[b]	6.9

[a] Calculated as the ratio of uptake rate in HEK293-OATP1B1 cells over that in HEK293 cells.

[b] Unit for these values: pmol/mg/min.

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; Av. Dev. = average deviation; ES = estrone sulfate.

Additional Information: No active uptake mediated by OATP1B1 was observed for M-1 at concentrations of 0.2 and 2 µM, indicating that M-1 is not a substrate for OATP1B1. In contrast, uptake was observed with ES (a probe substrate of OATP1B1) with an uptake ratio of 26, and the ratio was reduced to 6.9 in the presence of an OATP1B1/3 inhibitor (rifampicin), confirming the functionality of the expression system for OATP1B1.

OATP1B3

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.17 R-9571

Type of Study:	Transporter phenotyping						
Methods:	In vitro uptake of [^{3}H]M-1 in HEK293 cells stably transfected with OATP1B3 transporter.						
Analytical Method:	Liquid scintillation counting						
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**HEK293 cells (pmol/mg/10 min)**		**HEK293-OATP1B3 cells (pmol/mg/10 min)**		**Uptake Ratio[a]**
			Mean	**Av. Dev.**	**Mean**	**Av. Dev.**	
[^{3}H]M-1 (0.2 µM)	-	10	0.83	0.05	1.09	0.01	1.3
	BSP (10 µM)	10	0.80	0.03	0.84	0.04	1.0
	Rifampicin (5 µM)	10	0.88	0.01	0.83	0.01	0.9
[^{3}H]M-1 (2 µM)	-	10	7.89	0.54	10.9	0.3	1.4
	BSP (10 µM)	10	7.61	0.32	7.86	0.45	1.0
	Rifampicin (5 µM)	10	7.85	0.41	8.49	0.58	1.1
[^{3}H]BSP (0.05 µM)	-	7	0.48[b]	0.02[b]	1.27[b]	0.0003[b]	2.6
	Rifampicin (5 µM)	7	0.54[b]	0.04[b]	0.57[b]	0.02[b]	1.1

[a] Calculated as the ratio of uptake rate in HEK293-OATP1B3 cells over that in HEK293 cells.
[b] Unit for these values: pmol/mg/min.
Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; Av. Dev. = average deviation; BSP = sulfobromophthalein.
Additional Information: No active uptake mediated by OATP1B3 was observed for M-1 at concentrations of 0.2 and 2 µM, indicating that M-1 is not a substrate for OATP1B3. In contrast, uptake was observed with sulfobromophthalein (a probe substrate of OATP1B3) with an uptake ratio of 2.6, and the ratio was reduced to 1.1 in the presence of an OATP1B1/3 inhibitor (rifampicin), confirming the functionality of the expression system for OATP1B3.

2.6.5.15- 26 Pharmacokinetics: Inhibition of Human P-gp, BCRP, OATP1B1-, OATP1B3-, OAT1-, OAT3-, OCT1-, OCT2-, MATE1-, MATE2-K-, and BSEP-Mediated Transport by Vericiguat

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.12 PH-39110, 4.2.2.6.14 PH-39113, 4.2.2.6.19 PH-40670, 4.2.2.6.20 R-9867, 4.2.2.6.21 R-9698, 4.2.2.6.22 R-11193, 4.2.2.6.23 R-11114

Type of Study:	Inhibition potential on transporter proteins					
Methods:	LC-MS/MS; liquid scintillation counting.					
Tabulated Results:	In vitro evaluation of vericiguat as an inhibitor of human P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, and BSEP transporters					
Transporter	**Cell Lines**	**Probe Substrate**	**Vericiguat IC_{50} (µM)**	**Inhibition at Highest Concentration Tested**	**Estimated In vivo DDI risk (Yes/No)[a]**	**Report Number**
P-gp	LLC-PK1-MDR1 P-gp	Dipyridamole (2 µM)	>100	23% at 100 µM	No	4.2.2.6.12 PH-39110
P-gp	LLC-PK1-MDR1 P-gp	Digoxin (20 µM)	>100	27% at 100 µM	No	4.2.2.6.12 PH-39110
BCRP	MDCKII-BCRP	Topotecan (2 µM)	26	88% at 100 µM	No	4.2.2.6.14 PH-39113
BCRP	MDCKII-BCRP	Fluvastatin (2 µM)	20	92% at 100 µM	No	4.2.2.6.14 PH-39113
OATP1B1	HEK293-OATP1B1	Pravastatin (5 µM)	~16	65% at 50 µM	No	4.2.2.6.19 PH-40670
OATP1B3	HEK293-OATP1B3	Pravastatin (5 µM)	~30	60% at 50 µM	No	4.2.2.6.19 PH-40670
OAT1	HEK293-OAT1	[^{3}H]PAH (10 µM)	>5	-7.2% at 5 µM	No	4.2.2.6.20 R-9867
OAT3	HEK293-OAT3	[^{3}H]ES (1 µM)	>5	7.5% at 5 µM	No	4.2.2.6.20 R-9867
OCT1	HEK293-OCT1	[^{3}H]MPP (10 µM)	>50	11% at 50 µM	No	4.2.2.6.21 R-9698
OCT2	HEK293-OCT2	[^{3}H]MPP (10 µM)	>5	-1.0% at 5 µM	No	4.2.2.6.21 R-9698
MATE1	HEK293-MATE1	Metformin (50 µM)	>10	43% at 10 µM	No	4.2.2.6.22 R-11193
MATE2-K	HEK293-MATE2-K	Metformin (50 µM)	>10	1.7% at 10 µM	No	4.2.2.6.22 R-11193
NTCP/BSEP	SCHH ($CL_{Biliary}$)	d8-TCA (5 µM)	>100	32% at 100 µM	No	4.2.2.6.23 R-11114
BSEP	SCHH (BEI)	d8-TCA (5 µM)	>100	-2.0% at 100 µM	No	4.2.2.6.23 R-11114

[a] An assessment of DDI risk between vericiguat and co-administered substrates of these transporters, based on the 2020 FDA and 2012 EMA guidances, is provided in [2.6.5.15- 27] and [2.6.5.15- 28]

Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein; OATP1B1 = organic anion transporter 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter 1B3; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K; BSEP = bile salt export pump; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; DDI = drug-drug interaction; LLC-PK1 = LLC-PK1 = Lewis lung carcinoma pork kidney cell line; MDR1 = multidrug resistance protein 1; MDCKII = Madin-Darby canine kidney cells; HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; PAH = p-aminohippuric acid; ES = estrone sulfate; MPP = 1-methyl-4-phenylpyridinium; NTCP = sodium-taurocholate cotransporting polypeptide; SCHH = sandwich-cultured human hepatocytes; $CL_{Biliary}$ = in vitro biliary clearance; d8-TCA = taurocholic acid; BEI = biliary excretion index.

Additional information: IC_{50} values for OATP1B1 and 1B3 were determined following 1 h pre-incubation.

2.6.5.15- 27 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Transporter Inhibition by Vericiguat (FDA)

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.19 PH-40670, 4.2.2.6.21 R-9698, 4.2.2.6.20 R-9867, 4.2.2.6.22 R-11193, 4.2.2.6.12 PH-39110, 4.2.2.6.14 PH-39113

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between vericiguat and co-administered substrates of various transporters, based on the FDA guidance (2020)[a]							
Transporter	**Report Numbers**	**$[I]_{max,u}$ (µM)**	**$[I]_{in,max,u}$ (µM)**	**$[I]_2$ (µM)**	**IC_{50} (µM)**	**$[I]/IC_{50}$**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
	Systemic						
OATP1B1	4.2.2.6.19 PH-40670	-	0.03	-	~16	0.0018	0.1
OATP1B3	4.2.2.6.19 PH-40670	-	0.03	-	~30	0.0009	0.1
OCT1[b]	4.2.2.6.21 R-9698	-	0.03	-	>50	<0.0006	0.1
OAT1	4.2.2.6.20 R-9867	0.02	-	-	>5	<0.004	0.1
OAT3	4.2.2.6.20 R-9867	0.02	-	-	>5	<0.004	0.1
OCT2	4.2.2.6.21 R-9698	0.02	-	-	>5	<0.004	0.1
MATE1	4.2.2.6.22 R-11193	0.02	-	-	>10	<0.002	0.02
MATE2-K	4.2.2.6.22 R-11193	0.02	-	-	>10	<0.002	0.02
	Intestinal						
P-gp	4.2.2.6.12 PH-39110	-	-	94	>100	<1	10
BCRP	4.2.2.6.14 PH-39113	-	-	94	20	4.7	10

Notes: Molecular weight of vericiguat = 426.38 g/mol.
[a] FDA. (CDER) Jan. 2020
[b] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as for OATP1B1 and OATP1B3.
Abbreviations: FDA = Food and Drug Administration; DDI = drug-drug interaction; $[I]_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 10 mg vericiguat based on PopPK analysis [5.3.3.5.10 R-13341] 0.02 µM (vericiguat total I_{max} = 0.8 µM [350 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0218); $[I]_{in,max,u}$ = estimated unbound maximum plasma concentration at the inlet to the liver, 0.03 µM ($I_{in,max,u} = f_u \times (I_{max} + (F_a F_g \times k_a \times Dose)/Q_h/R_B)$, where fraction absorbed (F_a) =1, fraction escaping gut metabolism (F_g) =1, observed absorption rate constant (k_a) = 0.0212 min^{-1}, hepatic blood flow (Q_h) = 1617 mL/min, R_B (blood-to-plasma ratio) = 0.656; unbound fraction (f_u) = 0.0218); $[I]_2$ = theoretical maximum gastrointestinal drug concentration, calculated as the highest clinical dose on a molar basis in a volume of 250 mL; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; OATP1B1 = organic anion transporter 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K; P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein.

2.6.5.15- 28 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Transporter Inhibition by Vericiguat (EMA)

Test Article: Vericiguat
Report Number: 4.2.2.6.19 PH-40670, 4.2.2.6.21 R-9698, 4.2.2.6.20 R-9867, 4.2.2.6.22 R-11193, 4.2.2.6.12 PH-39110, 4.2.2.6.14 PH-39113

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between vericiguat and coadministered substrates of various transporters, based on the EMA guideline (2012)[a]						
Transporter	**Report Numbers**	**K_i[b] (µM)**	**50 × $C_{max,u}$ (µM)**	**25 × $I_{max,u}$ (µM)**	**0.1 × Dose/ 250 mL[c] (µM)**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
Systemic						
P-gp	4.2.2.6.19 PH-40670	>100	0.9	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
BCRP	4.2.2.6.19 PH-40670	20	0.9	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OATP1B1	4.2.2.6.21 R-9698	~16	-	0.7	-	$K_i \leq (25 \times I_{max,u})$
OATP1B3	4.2.2.6.20 R-9867	~30	-	0.7	-	$K_i \leq (25 \times I_{max,u})$
OCT1[d]	4.2.2.6.20 R-9867	>50	-	0.7	-	$K_i \leq (25 \times I_{max,u})$
OAT1	4.2.2.6.21 R-9698	>5	0.9	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT3	4.2.2.6.22 R-11193	>5	0.9	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OCT2	4.2.2.6.22 R-11193	>5	0.9	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE1	4.2.2.6.19 PH-40670	>10	0.9	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE2-K	4.2.2.6.19 PH-40670	>10	0.9	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
Intestinal						
P-gp	4.2.2.6.12 PH-39110	>100	-	-	9.4	$K_i \leq$ (0.1x Dose/250)
BCRP	4.2.2.6.14 PH-39113	20	-	-	9.4	$K_i \leq$ (0.1x Dose/250)

Notes: Molecular weight of vericiguat = 426.38 g/mol.

[a] Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Guideline on the investigation of drug interactions. In: CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. London, England: European Medicines Agency; 2012.

[b] $K_i = IC_{50}$, given that the concentration of the probe substrate for each transporter was << K_m value.

[c] Calculated using the clinical dose (10 mg), on a molar basis.

[d] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as OATP1B1 and OATP1B3.

Abbreviations: EMA = European Medicines Agency; DDI = drug-drug interaction; K_i = inhibition constant; $C_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 10 mg of vericiguat based on PopPK analysis [5.3.3.5.10 R-13341] 0.02 µM (vericiguat total I_{max} = 0.8 µM [350 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0218); $I_{max,u}$ = estimated unbound maximum plasma concentration at the inlet to the liver, 0.03 µM ($I_{max,u} = f_u \times (C_{max} + (F_a F_g \times k_a \times Dose)/Q_h/R_B)$, where fraction absorbed (F_a) =1, fraction escaping gut metabolism (F_g) =1, observed absorption rate constant (k_a) = 0.0212 min^{-1}, hepatic blood flow (Q_h) = 1617 mL/min, R_B (blood-to-plasma ratio) = 0.656; unbound fraction (f_u) = 0.0218); P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein; OATP1B1 = organic anion transporter 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K.

2.6.5.15- 29 Pharmacokinetics: Inhibition of Human P-gp, OATP1B1-, OATP1B3-, OAT1-, OAT3-, OCT1-, OCT2-, MATE1-, MATE2-K-, BCRP-, and BSEP-Mediated Transport by M-1

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.13 PH-39547, 4.2.2.6.15 PH-39548, 4.2.2.6.19 PH-40670, 4.2.2.6.20 R-9867, 4.2.2.6.21 R-9698, 4.2.2.6.22 R-11193, 4.2.2.6.23 R-11114

Type of Study:	Inhibition potential on transporter proteins					
Methods:	LC-MS/MS; Liquid scintillation counting.					
Tabulated Results:	In vitro evaluation of M-1 as an inhibitor of human P-gp, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, BCRP and BSEP transporters					
Transporter	**Cell Lines**	**Probe Substrate**	**M-1 IC_{50} (µM)**	**Inhibition at Highest ConcentrationTested**	**Estimated In vivo DDI risk (Yes/No)[a]**	**Report Number**
P-gp	LLC-PK1-MDR1 P-gp	Dipyridamole (2 µM)	>200	-5.5% at 200 µM	No	4.2.2.6.13 PH-39547
P-gp	LLC-PK1-MDR1 P-gp	Digoxin (20 µM)	>200	2.6% at 200 µM	No	4.2.2.6.13 PH-39547
BCRP	MDCKII-BCRP	Topotecan (2 µM)	>200	26% at 200 µM	No	4.2.2.6.15 PH-39548
OATP1B1	HEK293-OATP1B1	Pravastatin (5 µM)	25.6	62% at 50 µM	No	4.2.2.6.19 PH-40670
OATP1B3	HEK293-OATP1B3	Pravastatin (5 µM)	16.6	69% at 50 µM	No	4.2.2.6.19 PH-40670
OAT1	HEK293-OAT1	[^{3}H]PAH (10 µM)	>5	4.4% at 5 µM	No	4.2.2.6.20 R-9867
OAT3	HEK293-OAT3	[^{3}H]ES (1 µM)	>5	3.9% at 5 µM	No	4.2.2.6.20 R-9867
OCT1	HEK293-OCT1	[^{3}H]MPP (10 µM)	>50	-3.0% at 50 µM	No	4.2.2.6.21 R-9698
OCT2	HEK293-OCT2	[^{3}H]MPP (10 µM)	>5	10% at 5 µM	No	4.2.2.6.21 R-9698
MATE1	HEK293-MATE1	Metformin (50 µM)	>10	32% at 10 µM	No	4.2.2.6.22 R-11193
MATE2-K	HEK293-MATE2-K	Metformin (50 µM)	>10	3.6% at 10 µM	No	4.2.2.6.22 R-11193
NTCP/BSEP	SCHH ($CL_{Biliary}$)	d8-TCA (5 µM)	>100	27% at 100 µM	No	4.2.2.6.23 R-11114
BSEP	SCHH (BEI)	d8-TCA (5 µM)	>100	0.0% at 100 µM	No	4.2.2.6.23 R-11114

[a] An assessment of the potential contribution of M-1 to in vivo DDI risk between vericiguat and co-administered substrates of these transporters, based on the 2020 FDA and 2012 EMA guidances, is provided in [2.6.5.15- 30] and [2.6.5.15- 31], respectively.
Abbreviations: P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein; OATP1B1 = organic anion transporter 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter 1B3; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2K; NTCP = sodium-taurocholate cotransporting polypeptide; BSEP = bile salt export pump; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; DDI = drug-drug interaction; LLC-PK1 = LLC-PK1 = Lewis lung carcinoma pork kidney cell line; MDR1 = multidrug resistance protein 1; MDCKII = Madin-Darby canine kidney cells; HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; PAH = p-aminohippuric acid; ES = estrone sulfate; MPP = 1-methyl-4-phenylpyridinium; SCHH = sandwich-cultured human hepatocytes; $CL_{Biliary}$ = in vitro biliary clearance; d8-TCA = taurocholic acid; BEI = biliary excretion index.
Additional Information: IC_{50} values for OATP1B1 and 1B3 were determined following 1 h pre-incubation

2.6.5.15- 30 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Transporter Inhibition by M-1 (FDA)

Test Article: M-1
Report Number: 4.2.2.6.19 PH-40670, 4.2.2.6.21 R-9698, 4.2.2.6.20 R-9867, 4.2.2.6.22 R-11193

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between M-1 and coadministered substrates of various transporters, based on the FDA guidance (2020)[a]					
Transporter	**Report Numbers**	**$[I]_{max,u}$ (µM)**	**IC_{50} (µM)**	**$[I]/IC_{50}$**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
Systemic[b]					
OATP1B1	4.2.2.6.19 PH-40670	0.04	25.6	0.0017	0.1
OATP1B3	4.2.2.6.19 PH-40670	0.04	16.6	0.0026	0.1
OCT1[c]	4.2.2.6.21 R-9698	0.04	>50	<0.0009	0.1
OAT1	4.2.2.6.20 R-9867	0.04	>5	<0.009	0.1
OAT3	4.2.2.6.20 R-9867	0.04	>5	<0.009	0.1
OCT2	4.2.2.6.21 R-9698	0.04	>5	<0.009	0.1
MATE1	4.2.2.6.22 R-11193	0.04	>10	<0.004	0.02
MATE2-K	4.2.2.6.22 R-11193	0.04	>10	<0.004	0.02

Notes: Molecular weight of M-1 = 602.50 g/mol.
[a] FDA. (CDER) Jan. 2020
[b] M-1 was not dosed orally; therefore, only systemic DDIs are assessed.
[c] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as OATP1B1 and OATP1B3.
Abbreviations: FDA = Food and Drug Administration; DDI = drug-drug interaction; $[I]_{max,u}$ = unbound maximum M-1 plasma concentration in humans treated with 10 mg vericiguat based on PBPK analysis [5.3.3.5.7 PH-41143] 0.04 µM (M-1 total maximum plasma concentration = 2.7 µM [1610 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0163); IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; OATP1B1 = organic anion transporter 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K.

2.6.5.15- 31 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interaction, Transporter Inhibition by M-1 (EMA)

Test Article: M-1

Report Number: 4.2.2.6.13 PH-39547, 4.2.2.6.15 PH-39548, 4.2.2.6.19 PH-40670, 4.2.2.6.20 R-9867, 4.2.2.6.21 R-9698, 4.2.2.6.22 R-11193

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between M-1 and coadministered substrates of various transporters, based on the EMA guideline (2012)[a]				
Transporter	**Report Numbers**	**K_i[b] (µM)**	**50 × $C_{max,u}$ (µM)**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**
Systemic[c]				
P-gp	4.2.2.6.13 PH-39547	>200	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
BCRP	4.2.2.6.15 PH-39548	>200	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OATP1B1	4.2.2.6.19 PH-40670	25.6	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OATP1B3	4.2.2.6.19 PH-40670	16.6	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OCT1[d]	4.2.2.6.21 R-9698	>50	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT1	4.2.2.6.20 R-9867	>5	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT3	4.2.2.6.20 R-9867	>5	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OCT2	4.2.2.6.21 R-9698	>5	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE1	4.2.2.6.22 R-11193	>10	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE2-K	4.2.2.6.22 R-11193	>10	2	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$

Notes: Molecular weight of M-1 = 602.50 g/mol.

[a] Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Guideline on the investigation of drug interactions. In: CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. London, England: European Medicines Agency; 2012.

[b] $K_i = IC_{50}$, given that the concentration of the probe substrate for each transporter was << K_m value.

[c] M-1 was not dosed orally; therefore, only systemic DDIs are assessed.

[d] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as OATP1B1 and OATP1B3.

Abbreviations: EMA = European Medicines Agency; DDI = drug-drug interaction; K_i = Inhibition constant; $C_{max,u}$ = unbound maximum M-1 plasma concentration in humans treated with 10 mg of vericiguat based on PBPK analysis [5.3.3.5.7 PH-41143] 0.04 µM (M-1 total maximum plasma concentration = 2.7 µM [1610 ng/mL] and unbound fraction (f_u) = 0.0163); P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein; OATP1B1 = organic anion transporter 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2K.

2.6.5.16 薬物動態試験： その他

その他の薬物動態試験は実施しなかった。