目次

表一覧
図一覧
略号及び用語の定義
2.6.4 薬物動態試験の概要文
2.6.4.1 非臨床薬物動態試験の概要
2.6.4.1.1 DOR
2.6.4.1.2 ISL
2.6.4.1.3 DOR／ISL
2.6.4.2 分析法
2.6.4.2.1 生体試料中の ISL の定量
2.6.4.2.2 総放射能及び代謝プロファイルの検討
2.6.4.3 吸収
2.6.4.3.1 マウスにおける ISL の薬物動態
2.6.4.3.2 ラットにおける ISL の薬物動態
2.6.4.3.3 ウサギにおける ISL の薬物動態
2.6.4.3.4 サルにおける ISL の薬物動態
2.6.4.3.5 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける M4の薬物動態
2.6.4.4 分布
2.6.4.4.1 ラットにおける組織分布
2.6.4.4.1.1 単回投与時の定量的全身オートラジオグラフィー試験
2.6.4.4.1.2 反復投与時の定量的全身オートラジオグラフィー試験
2.6.4.4.1.3 単回 PET 試験
2.6.4.4.2 サルにおける組織分布
2.6.4.4.3 ラットにおける胎盤通過性
2.6.4.4.4 ISL の血漿蛋白質との結合
2.6.4.4.5 ISL の血液－血漿分配比
2.6.4.4.6 [^{14}C]ISL のヒト PBMC への取込み
2.6.4.4.7 M4の血漿蛋白質との結合
2.6.4.4.8 M4の血液－血漿分配比
2.6.4.5 代謝
2.6.4.5.1 In vivo 代謝
2.6.4.5.1.1 マウスにおける in vivo 代謝
2.6.4.5.1.2 ラットにおける in vivo 代謝
2.6.4.5.1.3 ウサギにおける in vivo 代謝
2.6.4.5.1.4 サルにおける in vivo 代謝
2.6.4.5.1.5 マウス、ラット及びサル長期安全性試験における血漿中の M4の評価
2.6.4.5.1.6 In vivo における PBMC 中の ISL 及びそのリン酸化同化物の細胞内濃度

2.6.4.5.1.6.1 ラット単回経口投与後の PBMC 中の ISL 及びそのリン酸化同化物の細胞内濃度の評価
2.6.4.5.1.6.2 サル単回経口投与後の PBMC 中の ISL 及びそのリン酸化同化物の細胞内濃度の評価
2.6.4.5.1.6.3 ISL の毒性試験における ISL 及びそのリン酸化同化物の PBMC 中濃度の評価
2.6.4.5.2 In vitro 代謝
2.6.4.5.2.1 ラット、サル及びヒトの肝細胞と腸管 S9画分における ISL の in vitro 代謝
2.6.4.5.2.2 ラット、サル及びヒト肝細胞における ISL の in vitro 取込み及び同化
2.6.4.5.2.3 マウス、サル及びヒト PBMC における ISL の in vitro 取込み及び同化
2.6.4.5.2.4 サル及びヒト PBMC 中における ISL 同化物の凍結融解安定性の in vitro 評価
2.6.4.6 排泄
2.6.4.6.1 マウスにおける排泄
2.6.4.6.1.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄
2.6.4.6.1.2 [^{14}C]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス
2.6.4.6.2 ラットにおける排泄
2.6.4.6.2.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄
2.6.4.6.2.2 [^{3}H]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス
2.6.4.6.3 ウサギにおける排泄
2.6.4.6.3.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄
2.6.4.6.3.2 [^{14}C]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス
2.6.4.6.4 サルにおける排泄
2.6.4.6.4.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄
2.6.4.6.4.2 [^{3}H]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス
2.6.4.6.5 ラットの乳汁中への ISL の排泄
2.6.4.6.6 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける M4の排泄
2.6.4.7 薬物相互作用
2.6.4.7.1 ISL 及び M4の消失に関与する薬物代謝酵素とトランスポーター
2.6.4.7.1.1 薬物代謝酵素
2.6.4.7.1.1.1 発現系ヒト ADA による ISL の in vitro 代謝
2.6.4.7.1.2 ISL のリン酸化における dCK の役割
2.6.4.7.1.2.1 In vitro における発現系ヒト dCK による ISL のリン酸化
2.6.4.7.1.2.2 In vitro における発現系ヒト dCK による3TC 及び FTC のリン酸化
2.6.4.7.1.2.3 3TC、FTC 及びエンテカビルによる ISL の一リン酸化の阻害
2.6.4.7.1.3 トランスポーター
2.6.4.7.1.3.1 薬物トランスポーターの基質としての ISL の評価
2.6.4.7.1.3.1.1 P-gp 及び BCRP の基質としての ISL の評価

2.6.4.7.1.3.1.2 腎薬物トランスポーターの基質としての ISL の評価
2.6.4.7.1.3.1.3 ヌクレオシドトランスポーターの基質としての ISL の評価
2.6.4.7.1.3.2 薬物トランスポーターの基質としての M4の評価
2.6.4.7.1.3.2.1 P-gp 及び BCRP の基質としての M4の評価
2.6.4.7.1.3.2.2 腎薬物トランスポーターの基質としての M4の評価
2.6.4.7.2 ISL 及び M4による薬物代謝酵素とトランスポーターの阻害
2.6.4.7.2.1 ISL による薬物代謝酵素の阻害
2.6.4.7.2.2 M4による薬物代謝酵素の阻害
2.6.4.7.2.3 ISL による薬物トランスポーターの阻害
2.6.4.7.2.4 M4による薬物トランスポーターの阻害
2.6.4.7.3 ISL 及び M4による CYP の誘導
2.6.4.7.3.1 ISL による CYP の誘導
2.6.4.7.3.2 M4による CYP の誘導
2.6.4.8 その他の薬物動態試験
2.6.4.8.1 ISL 及び M4による BSEP の阻害
2.6.4.9 考察及び結論
2.6.4.10 参考文献

表一覧

表 2.6.4-1 マウスにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態
表 2.6.4-2 ラットにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態
表 2.6.4-3 ウサギにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態
表 2.6.4-4 サルにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態
表 2.6.4-5 マウス、ラット、ウサギ及びサルに M4を単回静脈内投与した際の M4の薬物動態
表 2.6.4-6 妊娠20日のラットに ISL を1日1回経口投与したときの平均血漿中濃度 (TT #[redacted]-7190)
表 2.6.4-7 In vitro における種々の動物種の血漿蛋白質に対する ISL の可逆的結合
表 2.6.4-8 In vitro における種々の動物種での ISL の血液／血漿中濃度比
表 2.6.4-9 In vitro における種々の動物種の血漿蛋白質に対する M4の可逆的結合
表 2.6.4-10 In vitro における種々の動物種での M4の血液／血漿中濃度比
表 2.6.4-11 マウス、ラット、サル及びヒトに ISL を反復投与した際の血漿中 M4濃度
表 2.6.4-12 マウスに ISL 又は[^{14}C]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄
表 2.6.4-13 ラットに ISL 又は[^{3}H]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄
表 2.6.4-14 ウサギに ISL 又は[^{14}C]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄
表 2.6.4-15 サルに ISL 又は[^{3}H]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄
表 2.6.4-16 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける M4の尿中排泄率
表 2.6.4-17 発現系ヒト dCK による ISL、3TC 及び FTC のリン酸化に関する 速度論的パラメータ
表 2.6.4-18 種々の薬物トランスポーターに対する ISL の阻害作用
表 2.6.4-19 種々の薬物トランスポーターに対する M4の阻害作用

図一覧

図 2.6.4-1　ISL（A）及び M4（B）の構造
図 2.6.4-2　ラットにおける ISL 静脈内及び経口投与後の血漿中濃度推移
図 2.6.4-3　In vivo 及び in vitro における ISL の推定代謝物
図 2.6.4-4　ラット単回経口投与後の血漿中 ISL 並びに PBMC 中 ISL-DP 及び ISL-TP の濃度推移
図 2.6.4-5　サル単回経口投与後（50 mg/kg）の血漿中 ISL 並びに PBMC 中 ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の濃度推移
図 2.6.4-6　PBMC 中の ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度　（マウス新鮮血とのインキュベーション）
図 2.6.4-7　PBMC 中の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度　（サル新鮮血とのインキュベーション）
図 2.6.4-8　PBMC 中の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度　（ヒト新鮮血とのインキュベーション）
図 2.6.4-9　発現系ヒト ADA を介した ISL の酸化的脱アミノ反応による M4の生成速度
図 2.6.4-10　発現系ヒト dCK による ISL のリン酸化における ISL-MP の生成速度

略号及び用語の定義

略号	定義	
3TC	lamivudine	ラミブジン
ADA	adenosine deaminase	アデノシンデアミナーゼ
AME	absorption, metabolism, excretion	吸収、代謝及び排泄
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白質
BDC	bile duct-cannulated	胆管カニュレートした
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
C_{blood}	concentration in blood	血中濃度
C_{plasma}	concentration in plasma	血漿中濃度
CHO-K1	Chinese hamster ovary-K1	－
CLb	blood clearance	血液クリアランス
CLp	plasma clearance	血漿クリアランス
CLr	renal clearance	腎クリアランス
Cmax	observed maximum concentration	最高濃度
CNT	concentrative nucleoside transporter	濃縮型ヌクレオシドトランスポーター
CNT1	concentrative nucleoside transporter 1	濃縮型ヌクレオシドトランスポーター1
CNT2	concentrative nucleoside transporter 2	濃縮型ヌクレオシドトランスポーター2
CNT3	concentrative nucleoside transporter 3	濃縮型ヌクレオシドトランスポーター3
CYP	cytochrome P450	チトクロム P450
dCK	deoxycytidine kinase	デオキシシチジンキナーゼ
DOR	doravirine (MK-1439)	ドラビリン（MK-1439）
DP	diphosphate	二リン酸
EM	exposure multiple	曝露比
ENT	equilibrative nucleoside transporter	平衡型ヌクレオシドトランスポーター
ENT1	equilibrative nucleoside transporter 1	平衡型ヌクレオシドトランスポーター1
ENT2	equilibrative nucleoside transporter 2	平衡型ヌクレオシドトランスポーター2
EU	European Union	欧州連合
FDC	fixed dose combination	固定用量配合剤
FTC	emtricitabine	エムトリシタビン
GD	gestation day	妊娠日齢
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
HEK293	human embryonic kidney 293	－
HIV-1	human immunodeficiency virus type one	ヒト免疫不全ウイルス1型
HRMS	high resolution mass spectrometry	高分解能質量分析
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation (of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)	医薬品規制調和国際会議
ISL	islatravir (MK-8591 or [redacted])	イスラトラビル（MK-8591）
ISL-DP	islatravir diphosphate	イスラトラビル二リン酸体
ISL-MP	islatravir monophosphate	イスラトラビル一リン酸体
ISL-TP	islatravir triphosphate	イスラトラビル三リン酸体
IV	intravenous(ly)	静脈内
ka	absorption rate constant	吸収速度定数
K_i	inhibitory constant	阻害定数
K_m	Michaelis constant	ミカエリス定数
LC-HRMS	liquid chromatography-high resolution	液体クロマトグラフィー－高分解能質量

	mass spectrometry	分析
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LE	Long Evans	－
LLC-PK1	Lilly Laboratories cell-porcine kidney1	－
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計測
M4	islatravir metabolite M4, 4′-ethynyl-2-fluoro-2′-deoxyinosine	イスラトラビルの代謝物 M4、4’-エチニル-2-フルオロ-2’-デオキシイノシン
MATE1	multidrug and toxin extrusion protein 1	多剤・毒素排出輸送体1
MATE2K	multidrug and toxin extrusion protein 2K	多剤・毒素排出輸送体2
MDCKII	Madin-Darby canine kidney II	－
MP	monophosphate	一リン酸
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRP2	multidrug resistance protein 2	多剤耐性蛋白質2
MRP3	multidrug resistance protein 3	多剤耐性蛋白質3
MRP4	multidrug resistance protein 4	多剤耐性蛋白質4
MS/MS	tandem mass spectrometry	タンデム質量分析
NNRTI	non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor	非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NRTI	nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor	ヌクレオシド／ヌクレオチド系逆転写酵素阻害剤
NRTTI	nucleoside reverse transcriptase translocator inhibitor	ヌクレオシド系逆転写酵素トランスロケーション阻害剤
OAT1	organic anion transporter 1	有機アニオントランスポーター1
OAT3	organic anion transporter 3	有機アニオントランスポーター3
OATP1B1	organic anion transporting polypeptide 1B1	有機アニオン輸送ポリペプチド1B1
OATP1B3	organic anion transporting polypeptide 1B3	有機アニオン輸送ポリペプチド1B3
OCT1	organic cation transporter 1	有機カチオントランスポーター1
OCT2	organic cation transporter 2	有機カチオントランスポーター2
Papp	apparent permeability coefficient	見かけの膜透過係数
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PET	positron emission tomography	ポジトロン断層撮影法
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PO	oral(ly)	経口
QD	once daily	1日1回
rhADA	recombinant human adenosine deaminase	発現系ヒトアデノシンデアミナーゼ
rhdCK	recombinant human deoxycytidine kinase	発現系ヒトデオキシシチジンキナーゼ
Sf9	spodoptera frugiperda 9	－
SULT1E1	sulfotransferase 1E1	硫酸転移酵素1E1
t1/2	half-life	半減期
TDF	tenofovir disoproxil fumarate	テノホビルジソプロキシルフマル酸塩
Tmax	time to reach maximum concentration	最高濃度到達時間
TP	triphosphate	三リン酸
UGT	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase	ウリジン5’-二リン酸グルクロン酸転移酵素
UGT1A1	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1	ウリジン5’-二リン酸グルクロン酸転移酵素1A1
UPLC	ultra-performance liquid chromatography	超高速液体クロマトグラフィー

Vdss	volume of distribution at steady state	定常状態分布容積
V_{max}	maximum reaction velocity	最大反応速度
v/v	volume/volume	―
WH	Wistar Han	―
WT	wild type	野生型
w/v	weight/volume	―
w/w	weight/weight	―

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 非臨床薬物動態試験の概要

DOR/ISL［MK-8591A；DOR（MK-1439；100 mg）と ISL（MK-8591；0.25 mg）の FDC］は、成人 HIV-1感染症患者の治療に対する1日1回投与による2剤レジメンとして開発している。DOR と ISL はいずれも、強力な抗ウイルス活性を示し、重複のない相補的な耐性プロファイル並びに良好な安全性及び忍容性プロファイルを有することから、HIV 1感染症に対する有効な併用療法としての DOR/ISL の製造販売承認申請が支持される。

2.6.4.1.1 DOR

DOR は NNRTI であり、本邦、米国、EU、カナダ及び他の国々で HIV-1感染症の治療薬として承認されている。DOR/ISL における DOR の使用を支持する広範な非臨床試験については、DOR の製造販売承認申請資料[eCTD 受付番号310828004、2.4 項、2.6 項及び4 項]に示している。非臨床動物種に投与可能な製剤を経口投与した際、DOR は中程度（39%～47%）のバイオアベイラビリティを示した。DOR は in vitro で良好な見かけの膜透過性（Papp＝25×10^{-6} cm/s）を示したことから、バイオアベイラビリティは主に消化管での溶解性に依存することが示唆された。ラットにおいて、DOR の脳への移行性は限定的で、脳以外の組織に広く分布した。DOR は非臨床動物種及びヒトにおいて主に酸化的代謝を介して消失し、尿中への未変化体の排泄は主要な消失経路ではなかった。また、胆汁排泄も DOR の主要な消失経路ではない。In vitro 試験から、ヒトにおいて DOR は主に CYP3A で酸化的に代謝されることが示された。発現系酵素を用いた in vitro 速度論的試験では、CYP3A5と比較して代謝活性がより高く、相対的な存在量がより大きい CYP3A4は、DOR の代謝により大きく寄与することが示された。In vitro データに基づくと、DOR を CYP3A 阻害剤又は CYP3A 誘導剤と併用投与した場合に薬物相互作用が生じると予測され、CYP3A 阻害剤又は CYP3A 誘導剤を用いて実施した臨床薬物相互作用試験の結果は in vitro プロファイルと一貫していた。臨床において有効性が期待される用量を投与した際の非結合型薬物の Cmax では、DOR は主要なヒト CYP 分子種又はトランスポーターの阻害を示さないため、これらの経路を介した薬物相互作用を引き起こす可能性は低い。

2.6.4.1.2 ISL

ISL は HIV-1感染の治療薬として開発を進めてきた NRTTI で、内因性のキナーゼを介して細胞内で薬理学的な活性体である ISL-TP に変換される。本項では、毒性試験で用いた動物種であるマウス、ラット、ウサギ及びサル、並びにヒトにおける ISL の吸収、分布、代謝及び排泄について述べる。実施した非臨床試験の一覧を薬物動態の概要表[2.6.5.1 項]に示す。ISL の血漿蛋白結合、血液／血漿分配比、代謝及び排泄については、非臨床動物種とヒトの種間での比較のために示す。さらに、臨床における薬物相互作用のリスク評価の必要性を検討するため、種々の薬物代謝酵素及びトランスポーターに関し、ISL の基質認識性、阻害作用又は誘導作用を評価する in vitro 試験

を実施した。

マウス、ラット、ウサギ及びサルを用いた低用量の薬物動態試験では、ISL を30%カプチゾール水溶液（w/v）として静脈内投与、又は10% Tween 80水溶液（w/w）として経口投与した。GLP 適用の毒性試験で使用した製剤を用いて、曝露量の用量依存性を評価した。組織分布、代謝及び排泄試験は ISL の[^{3}H]、[^{14}C]又は[redacted]標識体を用いて実施した。

非臨床動物種において、静脈内投与後の ISL の CLp は中程度又は大きい（サル：17 mL/min/kg、ラット：72 mL/min/kg）、Vdss は概して中程度（1.5～4.3 L/kg）であった。また、ISL の t1/2は0.7～6.3時間、経口バイオアベイラビリティは約21%～100%であった。

ラット定量的全身オートラジオグラフィー試験では、[^{14}C]ISL を単回経口投与又は1日1回28日間反復経口投与し、組織への分布を検討した。単回経口投与した際、[^{14}C]ISL に関連した放射能は広範な組織に分布し、部分有色 LE ラットのリンパ系組織、代謝／排泄組織並びに消化管の大部分の組織で投与1時間後に最高濃度を示した。その後、放射能の速やかな消失が認められ、投与後168時間までに全ての組織で定量下限未満となった。LE ラットと WH ラットの間で、[^{14}C]ISL 関連の放射能の組織濃度は概して類似していたが、眼球のぶどう膜では LE ラットの方が WH ラットよりも僅かに高い放射能濃度を示した。また、LE ラットの有色皮膚部分における[^{14}C]ISL に関連した放射能濃度は、検討した最初の時点で、同ラットの無色素皮膚部分の放射能濃度よりも僅かに高かったが、投与後24時間までに無色素皮膚と同程度の放射能濃度まで低下した。これらの結果から、眼及び皮膚のメラニンに ISL 関連物質が可逆的に結合することが示唆された。

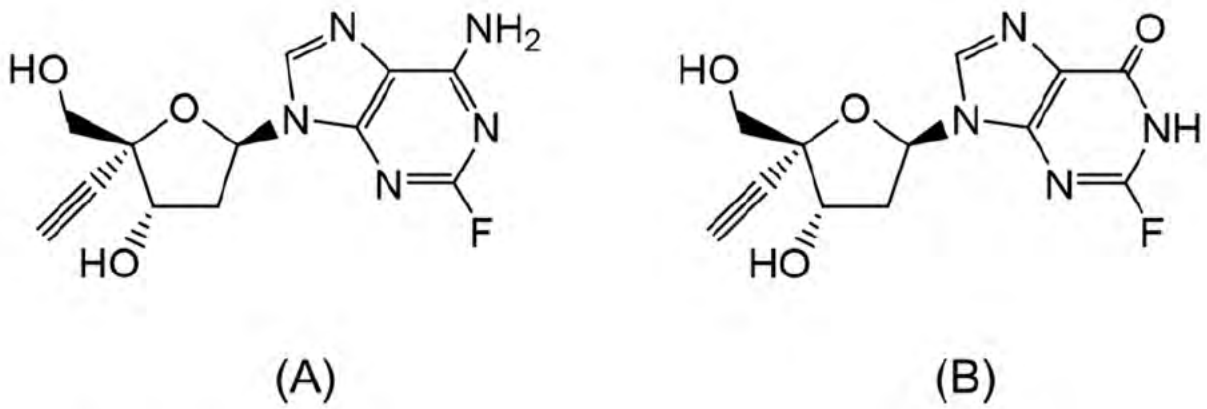
ラットに[^{14}C]ISL を28日間反復経口投与した際も、[^{14}C]ISL に関連した放射能は広範な組織に分布し、腎、脾、肝、リンパ節及び褐色脂肪組織で最も高い放射能濃度が認められた。主要組織中の[^{14}C]ISL に関連した放射能濃度は1日1回投与で14日間にわたって増加したが、14日目と28日目の組織中放射能濃度は同程度で、14日目と28日目の間で定常状態に達すると考えられた。初回投与後58日目までに、組織中放射能濃度の大部分は定量下限未満になった。

ラット及びサルに[redacted]ISL を単回静脈内マイクロドージングした際の組織分布を PET により評価した（ラットでは胸部より上の部分について画像評価した）。ラットでは、[redacted]ISL の関連物質は速やかに上腕、頸部及び顎下リンパ節に分布し、また、試験期間を通じて[redacted]ISL の関連物質の大部分は歯、手首（手根骨）、肩及び脊椎に認められた。サルでは、放射能は広範な組織に分布し、[redacted]ISL の関連物質が最も高濃度で認められた組織は膀胱、胆嚢及び脊髄であった。頸部、鼠径部、腋窩及び胸部リンパ節では、より低濃度で[redacted]ISL の関連物質が認められた。いずれの動物種でも、バックグラウンドを超える[redacted]ISL に関連した放射能は脳には検出されなかった。この結果は、in vitro で ISL の受動的透過性が低く（1.6～3.6×10^{-6} cm/s）、BCRP の基質であったことと一貫していた。ISL の血漿蛋白結合率は全ての動物種で低く、非結合型分率の平均値は0.825～0.968であった。血液／血漿分配比は1.1～1.3であり、ISL の血球への移行は中程度であることが示された。ラットにおいて、ISL は血液－胎盤関門を通過し、胎児／母体血漿中濃度比は0.4を超えていた。

ナトリウム依存性 CNT 又はナトリウム非依存性 ENT に対する選択的阻害薬の存在下及び非存在下で、新鮮ヒト PBMC を用いて[^{14}C]ISL の取込みを in vitro で評価した結果、ISL は受動拡散による取込みに加え、ヌクレオシドトランスポーターを介した能動輸送でも PBMC 中へ取り込まれることが示された。

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおいて、ISL は腎排泄及び M4（4'-エチニル-2-フルオロ-2'-デオキシイノシン）への酸化的脱アミノ反応を介して消失し、ISL の消失における胆汁／腸管排泄の寄与は小さかった。ISL 及び M4の構造式を[図 2.6.4-1]に示す。排泄物中に少量ながら検出された代謝物は、ISL の直接グルクロン酸抱合体、ISL の酸化生成物及び M4の直接グルクロン酸抱合体であった。ISL はヒト血漿中の主要な薬物関連成分（血漿中総放射能の58%）であり、M4は主要代謝物（血漿中総放射能の31%）であった。マウス、ラット、ウサギ及びサルを用いた試験でも、M4は血漿中代謝物として認められ、毒性試験での無毒性量投与時の M4濃度は、ISL を予定臨床推奨用量である0.25 mg でヒトに投与した際と比べ高かった（少なくとも223倍）。ヒトの排泄物中及び血漿中に検出された全ての ISL 代謝物は、マウス、ラット、ウサギ及び／又はサルでも認められた。

図 2.6.4-1　　ISL（A）及び M4（B）の構造



ISL=islatravir

ラット及びサルに ISL を経口投与した際、PBMC 中に ISL のリン酸化同化物である ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP が検出され、ISL-TP の細胞中半減期はラット及びサルでそれぞれ25時間及び49時間であった。また、マウス、ラット及びサルの反復経口投与毒性試験でも PBMC 中 ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP 濃度を測定した[2.6.6.1.2 項]。これら毒性試験において、ISL-TP は PBMC 中で主要な ISL 関連物質であった。

ヒトに[^{14}C]ISL（10 mg）を経口投与した際、投与放射能の大部分（91.4%）が尿中に排泄された

ことから、ISL の吸収は良好であることが示された。ISL は主に代謝（投与量の53%）及び未変化体の腎排泄（投与量の32%）を介して消失した[2.7.2.2.1.5 項]。

In vitro 代謝試験から、ISL は主に ADA によって代謝されることが示された。速度論的試験の結果から、ADA を介した M4への酸化的脱アミノ反応は250 μM までの ISL 濃度では飽和せず、K_m 値が250 μM を超える高い代謝能を有する過程であることが示唆された。ISL の消失には未変化体の腎排泄と CYP ではなく ADA による代謝が主として関与することから、CYP 又は UGT の阻害剤又は誘導剤を併用投与しても、臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低い。ISL の非臨床試験より、ISL を3TC、FTC やその他の dCK に高い親和性を示す基質と併用した際、ISL が dCK を介した相互作用を受け、in vivo において ISL のリン酸化が減少する可能性が示唆された。ISL は薬物トランスポーターである OAT1、OAT3、OCT2、MATE1、MATE2K 及び P-gp の基質ではないため、これらの薬物トランスポーターの阻害剤と併用投与した際、臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。ISL は BCRP の基質であるが、ヒト腎皮質での BCRP の発現は低く、腎の BCRP を介して臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低いことが報告されており[4.3: 08RGJ3][4.3: 05LFJQ]、ISL の体内動態［高い吸収率（約91%）、低い胆汁中排泄率（糞中排泄率が投与量の6.3%）］も踏まえると、BCRP を介した薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。PBMC への ISL の取込みには部分的に CNT が関与していると考えられる。ISL は CNT3の基質であり、CNT1及び CNT2に対しても弱い基質認識性を有する可能性が示唆されたが、ENT1及び ENT2の基質ではなかった。ISL の PBMC への取込みに複数の経路が関与していること、及び CNT の輸送能は高く、輸送の飽和はないと考えられることから、PBMC への ISL の取込みにおいて、臨床的に意味のある薬物相互作用は生じないと考えられる。M4は OAT1、OCT2、MATE1及び P-gp の基質ではないが、OAT3、MATE2K 及び BCRP の基質である。M4の排泄に腎での糸球体ろ過及び排出輸送の複数経路の寄与があることを考慮すると、M4をこれらの腎薬物トランスポーター阻害剤と併用投与しても、M4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。

In vitro 試験では、100 μM までの濃度の ISL 及び M4はいずれも、主要な薬物代謝酵素である CYP1A2、CYP2B6、CYP 2C8、CYP 2C9、CYP 2C19、CYP 2D6、CYP 3A4、UGT1A1及び UGT2B7に対して阻害作用を示さず、CYP1A2、CYP 2B6及び CYP 3A4に対して誘導作用を示さなかった。さらに、臨床的に意味のある濃度で、ISL 及び M4は OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2K、BCRP、P-gp 及び BSEP を阻害せず、IC_{50}値は50 μM を超えていた。また、ISL は MRP2、MRP3及び MRP4に対しても阻害作用を示さなかった（IC_{50}値：100 μM 超）。母集団薬物動態解析に基づき推定した ISL の予定臨床推奨用量（0.25 mg）での血漿中非結合型平均 Cmax（0.00335 μM）と比較して IC_{50}値が高いことから、これらの薬物代謝酵素及びトランスポーターの基質と臨床的に意味のある相互作用を起こさないと考えられる。ICH M12ガイドラインに従った ISL 及び M4の薬物相互作用のリスク評価から、ISL 又は M4に関連する薬物相互作用のリスクは低いことが示された。ISL を DOR（CYP3A の基質）、アトルバスタチン（OATP1B1の基質）、TDF（テノホビルのプロドラッグであり、その主要生成物であるテノホビルは OAT1及び OAT3の

基質）、メトホルミン（OCT2及びMATE1/2Kの基質）、メサドン（CYP1A2、CYP2D6及びCYP3Aの基質）、エチニルエストラジオール（CYP3A、UGT1A1及びSULT1E1の基質）、レボノルゲストレル（CYPの基質）又はドルテグラビル（BCRPの基質）と併用投与した際、これらの薬剤の薬物動態に対して臨床的に意味のある影響は認められなかった[2.7.2.3.3 項]。

以上のことから、ISL及びM4は薬物代謝酵素又はトランスポーターの阻害又は誘導により薬物相互作用を引き起こさないと考えられる。

2.6.4.1.3　DOR／ISL

DOR及びISLそれぞれの非臨床薬物動態プロファイルから、DORとISLは相互に作用しないと考えられるため、DOR及びISLの併用投与時の非臨床薬物動態試験は実施しなかった。

DOR/ISL FDCの各成分間で薬物相互作用が生じる可能性が低いことは、DOR及びISLの臨床薬物相互作用試験により確認した [2.7.2.3.3.3.1 項]。DOR/ISL FDCをCYP3A誘導剤又は阻害剤と併用投与した場合、DORの薬物動態にのみ顕著な変化が生じると考えられる。

2.6.4.2　分析法

2.6.4.2.1　生体試料中のISLの定量

非臨床試験で採取した血漿試料中のISLとM4を測定するため、バリデートした分析法及び探索的な分析法をLC-MS/MSを用いて開発した。また、非臨床試験で採取したPBMC中のISL、ISL-MP、ISL-DP及びISL-TPの細胞内濃度は、試験目的に応じた探索的検討のための品質保証を行ったLC-MS/MS法で測定した。測定のための前処理として、96ウェルプレートを用いて、血漿検体の除蛋白又は液－液抽出を行った。ISLとその内標準物質（[^{13}C,^{15}N$_3$]ISL）又はM4とその内標準物質（[^{13}C,^{15}N$_3$]M4）を逆相クロマトグラフィーによりMS/MSに導入し、エレクトロスプレーイオン化法でイオン化した上で、ISLは陽イオンモード、M4は陰イオンモードで検出した。非臨床試験でISL及びM4の定量に用いた測定法は、[2.6.5.2 項]に要約する。

GLP試験で用いたマウス、ラット、ウサギ及びサル血漿中ISL濃度の測定法は、試験実施時の規制ガイダンスに従ってバリデートし、GLPの原則にしたがって検体測定を行った[2.6.5.2 項]。また、トキシコキネティクス評価におけるM4の測定法は探索的評価のために開発し、試験目的に応じて非GLP下でマウス、ラット及びサルの血漿中濃度測定に使用した[2.6.5.2 項]。

バリデートしたISLの測定法の濃度範囲は、マウス血漿中では2～2000 ng/mLであった。ラット血漿中では最初2～2000 ng/mLの濃度範囲であったが、その後、より広域の0.5～2000 ng/mL及び低濃度域の0.1～200 ng/mLの濃度範囲でもバリデートした。また、ウサギ血漿中では1～5000 ng/mL、サル血漿中では最初2～2000 ng/mLの濃度範囲で、その後低濃度域の0.1～400 ng/mLでもバリデートした。

非臨床動物種における血漿中濃度測定法の真度及び精度を[2.6.5.3 項]に示す。

2.6.4.2.2 総放射能及び代謝プロファイルの検討

代謝及び排泄試験では、血漿、胆汁、尿及び糞中の総放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。血漿、胆汁、尿及び糞中の代謝物は逆相 UPLC カラムを用いて分離した。In vivo 及び in vitro 試験では、ラジオ検出器を装備した HRMS で ISL とその代謝物を検出した。代謝物の同定は正確な質量（exact mass）、MS/MS フラグメンテーションパターン及び UPLC での保持時間に基づいて行った。M4の構造は、これらの点について M4の合成標準品と比較して確認した。肝細胞及び PBMC の in vitro 代謝試料中の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP 濃度の測定は逆相 LC-MS/MS 法で行った。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 マウスにおける ISL の薬物動態

絶食下の雄性 CD-1マウスに ISL を単回静脈内投与及び経口投与した際の薬物動態パラメータを[表 2.6.4-1]と[2.6.5.4.1 項]に示す。雄性 CD-1マウスに1 mg/kg で ISL を単回静脈内投与した際、ISL の CLp、Vdss 及び t1/2はいずれも中程度であった。ISL の CLr も中程度（15.4 mL/min/kg）であった[2.6.5.15.1 項]。また、2 mg/kg で ISL を経口投与した際、ISL は速やかに吸収され、経口バイオアベイラビリティは21%であった。

表 2.6.4-1 マウスにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態

Dose (mg/kg)	Route	AUC0-inf (h*μM)	CLp (mL/min/kg)	Vdss (L/kg)	t1/2 (h)	Cmax (μM)	Tmax (h)	F[a] (%)
1	IV[b]	2.2	25.2	2.0	2.1	NA	NA	NA
2	PO[c]	2.4	NA	NA	NA	1.2	0.3	21

AUC0-inf=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; CLp=plasma clearance; Cmax=observed maximum concentration; F=bioavailability; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); n=number; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic(s); PO=oral(ly); t1/2=half-life; Tmax=time to reach maximum concentration; Vdss=volume of distribution at steady state.

Note: Data in mice represent mean values determined from sparse sampling of plasma from n=3 subjects per time point.

[a] F% in mouse was determined using the dose normalized mean AUC0-inf value at 2 mg/kg PO relative to the mean AUC0-inf at 1 mg/kg IV.

[b] Formulated in 30% captisol as a solution.

[c] Formulated in 10% Tween 80 as a solution.

[2.6.5.4.1 項]

2.6.4.3.2 ラットにおける ISL の薬物動態

絶食下の雄性 WH ラットに ISL を静脈内及び経口投与した際の ISL の薬物動態を検討した[2.6.5.4.1 項]。ISL を1 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際、ISL は高い CLp、中程度の Vdss 及び短い t1/2を示した[表 2.6.4-2]。ISL の CLr は低く、11.5 mL/min/kg であった[2.6.5.15.1 項]。ISL を5 mg/kg の用量で単回経口投与した際、ISL は速やかに吸収され、経口バイオアベイラビリティ

は127%で、ほぼ完全な吸収を示した。静脈内投与後、ISL の血漿中濃度は速やかに低下し、投与後4時間には定量下限未満となり、経口投与後の血漿中濃度推移との比較が可能となるような終末消失相の評価を十分に行うことはできなかった[図 2.6.4-2]。

表 2.6.4-2　ラットにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態

Dose (mg/kg)	Route	AUC0-inf (h*μM)	CLp (mL/min/kg)	Vdss (L/kg)	t1/2 (h)	Cmax (μM)	Tmax (h)	F[a] (%)
1	IV[b]	0.8 ± 0.0	72 ± 4	3.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1	NA	NA	NA
5	PO[c]	5.0 ± 0.7	NA	NA	NA	3.0 ± 0.6	0.6 ± 0.4	127[d] ± 2

AUC0-inf=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; CLp=plasma clearance; Cmax=observed maximum concentration; F=oral bioavailability; F=bioavailability; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); n=number; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic(s); PO=oral(ly); t1/2=half-life; Tmax=time to reach maximum concentration; Vdss=volume of distribution at steady state.

Note: Data represent mean values ± standard deviation from n=3 subjects.

[a] F% was calculated using the dose normalized individual AUC0-inf values for PO relative to the mean AUC0-inf for IV.

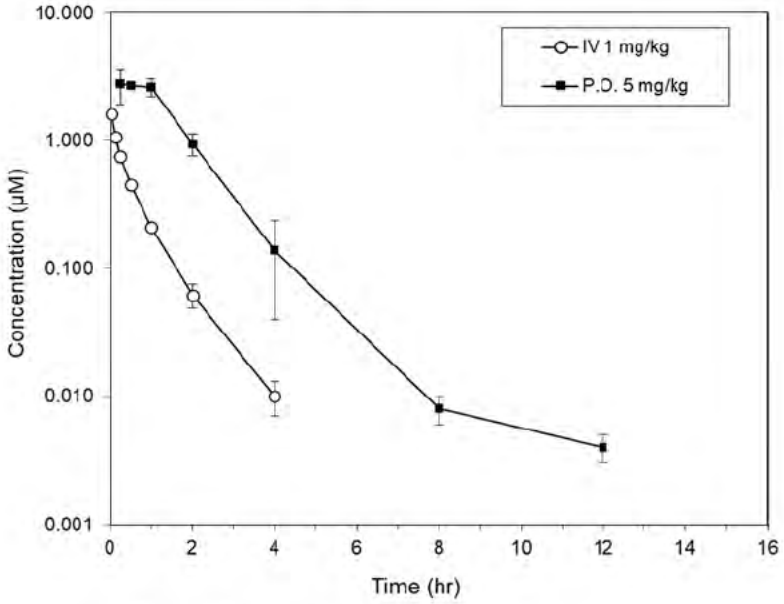
[b] Formulated in 30% captisol as a solution.

[c] Formulated in 10% Tween 80 as a solution.

[d] The F of >100% likely resulted from an underestimation of the AUC0-inf for the IV dose, attributed to limitation in the lower limit of quantification.

[2.6.5.4.1 項]

図 2.6.4-2 ラットにおける ISL 静脈内及び経口投与後の血漿中濃度推移



hr=hour(s); IV=intravenous(ly); n=number; PO=oral(ly).

Note: Data represent mean ± standard deviation (n=3).

[2.6.5.4.1 項]

2.6.4.3.3 ウサギにおける ISL の薬物動態

絶食下の雌性 Dutch Belted ウサギに ISL を静脈内及び経口投与した際の ISL の PK パラメータを[表 2.6.4-3]と[2.6.5.4.2 項]に示す。雌性ウサギに ISL を1 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際、ISL の CLp、Vdss 及び t1/2はいずれも中程度であった。CLr は小さい又は中程度（5.3 mL/min/kg）であった[2.6.5.15.1 項]。ISL を2 mg/kg の用量で経口投与した際、ISL は速やかに吸収され、経口バイオアベイラビリティは45%であった。

表 2.6.4-3 ウサギにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態

Dose (mg/kg)	Route	AUC0-inf (h*μM)	CLp (mL/min/kg)	Vdss (L/kg)	t1/2 (h)	Cmax (μM)	Tmax (h)	F[a] (%)
1	IV[b]	3.5 ± 0.8	17.2 ± 4.9	1.5 ± 0.4	2.3 ± 1.0	NA	NA	NA
2	PO[c]	3.1 ± 1.2	NA	NA	NA	1.4 ± 0.9	0.8 ± 0.3	45 ± 15

AUC0-inf=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; CLp=plasma clearance; Cmax=observed maximum concentration; F=bioavailability; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); n=number; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic(s); PO=oral(ly); t1/2=half-life; Tmax=time to reach maximum concentration; Vdss=volume of distribution at steady state.

Note: Data represent mean values ± standard deviation from n=3 subjects.

[a] F% was calculated using the dose normalized individual AUC0-inf values for PO relative to the mean AUC0-inf for IV.

[b] Formulated in 30% captisol as a solution.

[c] Formulated in 10% Tween 80 as a solution.

[2.6.5.4.2 項]

2.6.4.3.4 サルにおける ISL の薬物動態

絶食下の雌雄アカゲザルに ISL を単回静脈内投与及び経口投与した際の ISL の PK パラメータを[表 2.6.4-4]と[2.6.5.4.2 項]に示す。雄性サルに ISL を1 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際、ISL の CLp、Vdss 及び t1/2はいずれも中程度であった。同試験にて評価した ISL の CLr は中程度（8.7 mL/min/kg）であった[2.6.5.15.1 項]。ISL を5 mg/kg の用量で雌雄サルに経口投与した際、ISL は速やかに吸収され、経口バイオアベイラビリティは38%であった。

表 2.6.4-4 サルにおける単回静脈内及び経口投与後の ISL の薬物動態

Dose (mg/kg)	Route	AUC0-inf (h*μM)	CLp (mL/min/kg)	Vdss (L/kg)	t1/2 (h)	Cmax (μM)	Tmax (h)	F[a] (%)
1	IV[b]	3.4 ± 0.7	17.1 ± 3.3	4.3 ± 1.3	6.3 ± 0.7	NA	NA	NA
5	PO[c]	6.5 ± 3.0	NA	NA	NA	1.5 ± 0.7	1.7 ± 0.6	38 ± 18

AUC0-inf=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; CLp=plasma clearance; Cmax=observed maximum concentration; F=bioavailability; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); n=number; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic(s); PO=oral(ly); t1/2=half-life; Tmax=time to reach maximum concentration; Vdss=volume of distribution at steady state.

Note: Data represent mean values ± standard deviation from n=3 subjects.

[a] F% was calculated using the dose normalized individual AUC0-inf values for PO relative to the mean AUC0-inf for IV.

[b] Formulated in 30% captisol as a solution.

[c] Formulated in 10% Tween 80 as a solution.

[2.6.5.4.2 項]

2.6.4.3.5 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける M4の薬物動態

マウス、ラット、ウサギ及びサルに M4を1 mg/kg の用量で急速静脈内投与した際の M4の PK パ

ラメータを[表 2.6.4-5]と[2.6.5.5 項]に示す。M4の薬物動態は動物種間で類似しており、CLp は中程度であった。Vdss は動物種にわたって小さく、終末相の t1/2は短かった。M4の CLr は中程度又は高かった[2.6.5.5 項]。

表 2.6.4-5 マウス、ラット、ウサギ及びサルに M4 を単回静脈内投与した際の M4 の薬物動態

Species	Dose[a] (mg/kg)	AUC0-inf (h*μM)	CLp (mL/min/kg)	CLr (mL/min/kg)	Vdss (L/kg)	t1/2 (h)
Mouse[b]	1	1.5	38.7	20.4	0.28	0.36
Rat[c]	1	2.1 ± 0.1	27.7 ± 1.3	21.3 ± 3.1	0.88 ± 0.06	0.45 ± 0.01
Rabbit[c]	1	1.8 ± 0.5	33.5 ± 8.4	21.1 ± 9.1	0.56 ± 0.11	0.25 ± 0.09
Monkey[c]	1	5.4 ± 2.6	12.0 ± 4.8	6.5 ± 1.9	0.49 ± 0.18	1.0 ± 0.5

AUC0-inf=area under the concentration-time curve from time zero to infinity; CLp=plasma clearance; CLr=renal clearance; h=hour(s); ISL=islatravir; min=minute(s); n=number; PK=pharmacokinetic(s): t1/2=half-life; Vdss=volume of distribution at steady state.

[a] Formulated in 30% captisol as a solution.

[b] Data represent mean values determined from sparse sampling of plasma from n=3 subjects per time point.

[c] Data represent mean values ± standard deviation from n=3 subjects.

[2.6.5.5 項]

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 ラットにおける組織分布

2.6.4.4.1.1 単回投与時の定量的全身オートラジオグラフィー試験

雄性有色 LE 及び無色素の WH ラットを用いて ISL の組織分布を検討した。10% Tween80水溶液で調製した投与液を用いて、[^{14}C]ISL を3 mg/kg の用量で経口投与し、LE ラットでは投与後1～168時間の複数時点[2.6.5.6.1 項]、WH ラットでは投与後1及び168時間の2時点[2.6.5.6.3 項]で試料を採取した。

放射能は広範囲の組織に分布し、大部分の組織で投与後1時間に最も高い放射能濃度を示した。大部分の組織では組織／血漿中濃度比は1より大きかったが、中枢神経系、眼及び生殖器等の一部の組織では組織／血漿中濃度比は1未満であった[2.6.5.6.2 項][2.6.5.6.4 項]。LE 及び WH ラットのいずれにおいても放射能の速やかな消失が認められ、投与後168時間までに全ての組織中濃度は定量下限未満となった。LE 及び WH ラットで全体的に[^{14}C]ISL 由来の放射能が最も高かったのは、リンパ系組織、代謝／排泄組織及び消化管であった。LE 及び WH ラットのいずれにおいても、投与後1時間では脳で[^{14}C]ISL 由来の測定可能な放射能が認められたが、その後定量下限未満となった。投与後1時間での脳における組織／血漿中濃度比は0.04～0.20と低く、ラットで ISL の中枢移行性は低いことが示唆された[2.6.5.6.2 項][2.6.5.6.4 項]。部分有色 LE 及び無色素 WH ラットの間で評価時点における[^{14}C]ISL 由来の組織中放射能濃度は概して類似していたが、眼のブドウ膜では LE ラットの方が WH ラットよりも僅かに高かった。投与後1～10時間で、[^{14}C]ISL 由来の組織

中放射能濃度は、部分有色 LE ラットの無色素の皮膚部分に比べ有色の皮膚部分で僅かに高かったが、投与後24時間までに有色皮膚と無色素皮膚の放射能濃度は同程度となり、投与後168時間までに定量下限未満となった。これらの結果は、眼や皮膚のメラニンと ISL 関連物質には可逆的な関連性があることを示唆している[2.6.5.6.1 項][2.6.5.6.3 項]。

2.6.4.4.1.2 反復投与時の定量的全身オートラジオグラフィー試験

雄性 WH ラットに10% Tween 80水溶液で調製した投与液を用いて[^{14}C]ISL を50 mg/kg の用量で1日1回28日間反復経口投与し、初回投与後36及び58日目まで休薬した際の ISL の組織分布を定量的全身オートラジオグラフィーにより評価した。測定試料（各時点で n=1）は、初回投与後0.5、24時間及び7、14、28日（全て各日の投与後24時間）で採取し、1日1回28日間投与終了後も放射標識物質の消失を評価するため、初回投与後36及び58日目で試料を採取し、定量的全身オートラジオグラフィーを用いて測定した[2.6.5.6.5 項]。

[^{14}C]ISL は1、2、7、14及び28日目の投与後に、腎臓、脾臓、肝臓、リンパ節、褐色脂肪組織で最も高い濃度を示し、広範な組織に分布した。主要な組織中の[^{14}C]ISL 関連物質の濃度は1日1回投与では14日間にわたって増加したが、投与14日目と28日目の組織中濃度は類似しており、この間で上昇はみられなかった。最終投与後の[^{14}C]ISL 関連物質の濃度は、投与開始後36日目では大部分の組織で減少し、58日目までに大部分の組織で定量下限未満になった[2.6.5.6.5 項]。リンパ節中の[^{14}C]ISL 関連物質の濃度は腎臓、脾臓、肝臓及び褐色脂肪中の濃度と類似していた。リンパ節中で[^{14}C]ISL 関連物質が高濃度であったことは、PBMC 中に ISL が取り込まれ、同化されることと一貫しており、リンパ節中の[^{14}C]ISL 関連物質はリン酸化同化物として PBMC 中に存在すると考えられる[2.6.4.5.1.6.1 項][2.6.4.5.2.3 項][2.6.5.12.4 項][2.6.5.13.5 項]。また、各時点で、投与経路に起因して[^{14}C]ISL 関連物質の高い濃度が消化管で観察された[2.6.5.6.5 項]。

ラットの歯では、[^{14}C]ISL 関連物質は初回投与後0.5時間で最高濃度を示し、24時間で定量下限未満に低下した。初回投与後0.5時間では、象牙質やエナメル質と比べて、[^{14}C]ISL 関連物質は歯髄で最も高濃度であったが、投与後24時間では定量下限未満であった。また、1日1回投与の7、14及び28日目で、定量可能な濃度で[^{14}C]ISL 関連物質が歯に認められ、臼歯よりも切歯の濃度が高かった。1日1回投与の7、14及び28日目の切歯中の[^{14}C]ISL 関連物質濃度は、歯髄と象牙質では類似していたが、エナメル質での濃度はそれよりも低かった。初回投与後36日目で臼歯と切歯のいずれにおいても歯髄と象牙質の[^{14}C]ISL 関連物質濃度は顕著に減少した。36日目までには、臼歯及び切歯ともにエナメル質の濃度は定量下限未満となった。全ての歯の濃度は初回投与後58日目で定量下限未満となったが、下顎切歯の歯髄でのみ28日目に比べ顕著に低い[^{14}C]ISL 関連物質濃度が認められた[2.6.5.6.5 項]。

主要な組織における[^{14}C]ISL 関連物質の推定総分布量の1日投与量に対する割合は低く、初回投与後0.5時間で約16%、24時間で約1%であった[2.6.5.6.6 項]。これらの結果から、[^{14}C]ISL 関連物質は主要組織に分布し、速やかに消失することが示された。また、1日1回反復投与での主要組織に

おける同分布量の1日投与量に対する割合は、投与7日目で約4%、14日目で約11%、28日目で約18%であった[2.6.5.6.6 項]。ラットの体重の約40%を占める骨格筋では、[^{14}C]ISL 関連物質の分布量の投与量に対する割合が各測定時点において最も高く、1日1回投与の28日目での割合は約9.7%であった。皮膚及び肝臓での分布量は、1日1回投与の28日目まで投与日間で経時的に増加し、28日目ではそれぞれ3.0%及び2.3%であった。主要組織における放射能濃度は、投与の中止により低下し、初回投与後36日目及び58日目での[^{14}C]ISL 関連物質の推定総分布量の1日投与量に対する割合はそれぞれ8.1%及び0.1%であった。投与開始後58日目では大部分の組織で定量下限未満となり、[^{14}C]ISL 関連物質は主要組織からほとんど消失した[2.6.5.6.6 項]。

2.6.4.4.1.3 単回 PET 試験

雄性 WH ラットに ISL をマイクロドーズ（0.1 μg 未満）で単回静脈内投与した際の ISL の組織分布を PET で評価した。[redacted]ISL を生理食塩水に溶解して急速静脈内投与し、投与後180分まで PET スキャンを実施したところ（ラットでは胸部より上の部分について画像評価した）[2.6.5.6.7 項]、投与後30分では [redacted]ISL 関連物質が上腕、頸部及び顎下リンパ節に同程度で多く認められた。投与後60～180分には[redacted]ISL 関連物質の大部分が歯並びに手首（手根骨）、肩及び脊椎周囲に認められたが、脳では放射能は検出されなかった。PET 試験で早期にリンパ節及び歯への分布が認められたことは、定量的全身オートラジオグラフィー解析で得られた結果と、ISL が効果的に PBMC へ取り込まれてリン酸化されることと一貫していた[2.6.5.6.1 項][2.6.5.6.3 項][2.6.5.6.5 項][2.6.5.6.7 項][2.6.5.12.4 項]。

2.6.4.4.2 サルにおける組織分布

雄性アカゲザルに ISL をマイクロドーズ（1 ng 未満）で単回静脈内投与した際の ISL の組織分布を PET で評価した。[redacted]ISL を生理食塩水に溶解して急速静脈内投与し、投与後182分まで PET スキャンを実施したところ[2.6.5.7 項]、投与後約160分の時点で、[redacted]ISL 関連物質の濃度が最も高かった組織は、膀胱、胆嚢及び脊椎であり、膀胱内濃度は胆嚢中濃度の約2.4倍、脊髄中濃度の約7.4倍であった[2.6.5.7 項]。同時点で、[redacted]ISL 関連物質がより低い濃度で他の組織（指関節、代謝／排泄組織、精巣及びリンパ節）でも認められた。脳ではバックグラウンドレベルと同程度であり、明らかな[redacted]ISL 関連の放射能は検出されなかった[2.6.5.7 項]。

2.6.4.4.3 ラットにおける胎盤通過性

妊娠 WH ラットに3又は50 mg/kg/day で ISL 懸濁液を妊娠6日から妊娠20日まで経口投与し、ISL の胎盤通過性を検討した（TT #[redacted]-7190） [2.6.5.8 項]。妊娠20日の投与後0.5及び1時間で母動物と胎児の血液試料を採取し、血漿中薬物濃度を測定した。全てのラットは計画された試験終了時まで生存した。胎児／母動物の血漿中 ISL 濃度比は0.463～0.877であり、ISL はラットの胎盤を通過することが示された[表 2.6.4-6]。

表 2.6.4-6　妊娠 20 日のラットに ISL を 1 日 1 回経口投与したときの平均血漿中濃度 (TT #[redacted]-7190)

Matrix	Dose (mg/kg/day)			
	3		50	
	Time (h)		Time (h)	
	0.5	1	0.5	1
Maternal Plasma (µM)	1.57 ± 0.193	1.05 ± 0.106	15.1 ± 3.03	13.9 ± 1.57
Fetal Plasma (µM)	0.882 ± 0.118	0.912 ± 0.051	6.75 ± 1.07	9.69 ± 0.967
Fetal/Maternal Concentration Ratio[a]	0.562 ± 0.0210	0.877 ± 0.041	0.463 ± 0.029	0.701 ± 0.021

GD=gestation day; h=hour(s); ISL=islatravir; n=number; PO=oral(ly).

Note: Values represent mean ± standard error of the mean (n=4).

[a] Fetal/maternal plasma concentration ratios were calculated by dividing the individual fetal plasma concentration by the corresponding maternal plasma concentration. Mean and standard error values of the ratio were calculated from the ratios determined from individual subjects.

[2.6.5.8 項]

2.6.4.4.4　ISL の血漿蛋白質との結合

ISL 濃度0.1、1.0及び10 µM での血漿蛋白質との可逆的結合を平衡透析法で分析した。マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト血漿における ISL の血漿蛋白結合率は低く、非結合型分率の平均値は0.825～0.968であり[表 2.6.4-7]、ISL は0.1～10 µM の範囲で濃度依存的な結合を示さなかった[2.6.5.9 項]。

表 2.6.4-7　In vitro における種々の動物種の血漿蛋白質に対する ISL の可逆的結合

Compound	Species	Concentration (µM)	Mean Unbound Fraction[a]
ISL	Mouse	0.1 to 10	0.963 ± 0.013
	Rat	0.1 to 10	0.928 ± 0.111
	Rabbit	0.1 to 10	0.825 ± 0.025
	Monkey	0.1 to 10	0.855 ± 0.017
	Human	0.1 to 10	0.968 ± 0.020

ISL=islatravir

[a] Values represent mean ± standard deviation of the measured unbound fractions at 0.1, 1.0, and 10 µM ISL.

[2.6.5.9 項]

2.6.4.4.5　ISL の血液－血漿分配比

非臨床動物種及びヒトから採取した新鮮血と血漿を用いて、in vitro における ISL 濃度0.1、1.0及び10 µM での血球への移行性を検討した。マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおける血液／血漿中濃度比は1.1～1.3であったことから、ISL の中程度の血球移行性が示された[表 2.6.4-8]。したがって、これら全ての動物種において、CLb は CLp よりも顕著に低くならないと考えられる。

0.1～10 μM の検討濃度範囲において、ISL の血液－血漿分配に ISL 濃度依存性はみられなかった[2.6.5.10 項]。

表 2.6.4-8 In vitro における種々の動物種での ISL の血液／血漿中濃度比

Compound	Species	ISL Blood Concentration (μM)	C_{blood}/C_{plasma} Ratio[a]
ISL	Mouse	0.1 to 10	1.2 ± 0.1
	Rat	0.1 to 10	1.1 ± 0.0
	Rabbit	0.1 to 10	1.3 ± 0.1
	Monkey	0.1 to 10	1.1 ± 0.2
	Human	0.1 to 10	1.3 ± 0.1

C_{blood}=concentration in blood ; C_{plasma}=concentration in plasma; ISL=islatravir.

[a] Values represent mean ± standard error or standard error of the mean of the measured blood-to-plasma concentration ratios at 0.1, 1.0, and 10 μM ISL.

[2.6.5.10 項]

2.6.4.4.6 [^{14}C]ISL のヒト PBMC への取込み

新鮮ヒト PBMC を用いて、ナトリウム依存性 CNT 又はナトリウム非依存性 ENT に対する選択的阻害薬の存在下及び非存在下で、[^{14}C]ISL の取込みを in vitro で評価した[2.6.5.11 項]。[^{14}C]ISL の取込みにおいて時間及び濃度依存性がみられ、受動拡散に加え、ヌクレオシドトランスポーターを介した能動輸送でも PBMC 中に取り込まれることが示された。PBMC への ISL の取込みは CNT の阻害薬により部分的に阻害されたが、ENT の阻害薬による影響はそれよりもかなり小さかった[2.6.5.11 項]。

2.6.4.4.7 M4の血漿蛋白質との結合

M4濃度0.1、1.0及び10 μM での血漿蛋白質との可逆的結合率も低く、マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトの血漿における非結合型分率の平均値は0.849～0.972であった[表 2.6.4-9]。M4は0.1～10 μM の範囲で濃度依存的な結合を示さなかった[2.6.5.9 項]。

表 2.6.4-9 In vitro における種々の動物種の血漿蛋白質に対する M4 の可逆的結合

Compound	Species	Concentration (μM)	Mean Unbound Fraction[a]
M4	Mouse	0.1 to 10	0.961 ± 0.029
	Rat	0.1 to 10	0.972 ± 0.022
	Rabbit	0.1 to 10	0.849 ± 0.022
	Monkey	0.1 to 10	0.909 ± 0.055
	Human	0.1 to 10	0.936 ± 0.019

ISL=islatravir.
[a] Values represent mean ± standard deviation of the measured unbound fractions at 0.1, 1.0, and 10 μM M4.

[2.6.5.9 項]

2.6.4.4.8 M4の血液－血漿分配比

各非臨床動物種における M4の血液／血漿中濃度比は、ISL よりも概して低く、0.6～1.0であった[表 2.6.4-10]。マウスでは CLb は CLp と同程度であったが、ラット、ウサギ、サル及びヒトでは CLp よりも CLb は僅かに高かった。0.1～10 μM の検討濃度範囲において、M4の血液－血漿分配に M4濃度依存性はみられなかった[2.6.5.10 項]。

表 2.6.4-10 In vitro における種々の動物種での M4 の血液／血漿中濃度比

Compound	Species	M4 Blood Concentration (μM)	C_{blood}/C_{plasma} Ratio[a]
M4	Mouse	0.1 to 10	1.0 ± 0.2
	Rat	0.1 to 10	0.8 ± 0.1
	Rabbit	0.1 to 10	0.8 ± 0.0
	Monkey	0.1 to 10	0.6 ± 0.1
	Human	0.1 to 10	0.6 ± 0.1

C_{blood}=concentration in blood ; C_{plasma}=concentration in plasma; ISL=islatravir.
[a] Values represent mean ± standard error of the mean of the measured blood-to-plasma concentration ratios at 0.1, 1.0, and 10 μM M4.

[2.6.5.10 項]

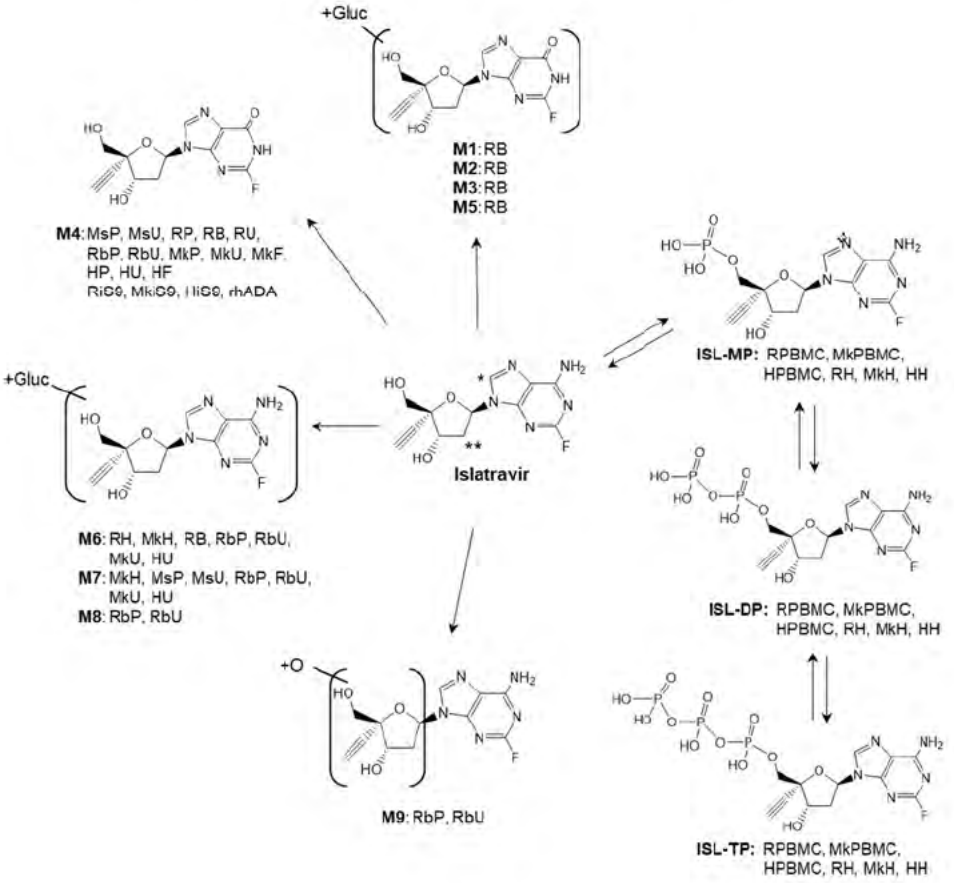
2.6.4.5 代謝

2.6.4.5.1 In vivo 代謝

無処置雄性 CD-1マウス、無処置及び胆管カニュレートした雄性 WH ラット、無処置雌性 Dutch Belted ウサギ、並びに胆管カニュレートしたアカゲザルを用いて、10% Tween 80溶液で調製した ISL の放射標識体([^{3}H]ISL 又は[^{14}C]ISL)を単回経口投与し、ISL の in vivo 代謝を検討した[2.6.5.12.1 項]。ヒトにおける ISL の代謝は[^{14}C]ISL を経口投与した健康被験者で評価した（025試験）[2.7.2.3.1.4.3 項]。排泄物中、血漿中及び PBMC 中で同定された代謝物の構造は HRMS 又は LC-MS/MS 分析に基づいて推定した[図 2.6.4-3][2.6.5.14 項]。M4の構造は合成した標品との比較によ

り確認した。ISL は主として酸化的脱アミノ反応による M4への代謝と未変化体の腎排泄を介して消失することが示された。

図 2.6.4-3 In vivo 及び in vitro における ISL の推定代謝物



*Indicates the position of [^{3}H]-label.

**Indicates the position of [^{14}C]-label.

DP=diphosphate; Gluc=glucuronide; HF=human feces; HH=human hepatocytes; HiS9=human intestinal S9; HP=human plasma; HPBMC=human peripheral blood mononuclear cells; HU=human urine; ISL=islatravir; MkF=monkey feces; MkH=monkey hepatocytes; MkiS9=monkey intestinal S9; MkP=monkey plasma; MkPBMC=monkey peripheral blood mononuclear cells; MkU=monkey urine; MP=monophosphate; MsP=mouse plasma; MsU=mouse urine; RB=rat bile; RbU=rabbit urine; RH=rat hepatocytes; rhADA=recombinant human adenosine deaminase; RiS9=rat intestinal S9; RP=rat plasma; RPBMC=rat peripheral blood mononuclear cells; RU=rat urine; TP=triphosphate.

[2.6.5.14 項]

2.6.4.5.1.1 マウスにおける in vivo 代謝

無処置雄性 CD-1マウスに[^{14}C]ISL を5 mg/kg の用量で経口投与し、血漿中及び排泄物中の代謝物を検討した。投与放射能の大部分（70.9%）が尿中に排泄されたことから、ISL の吸収は良好であることが示された[2.6.5.15.2 項]。吸収率は経口投与時のバイオアベイラビリティ（21%）よりも高く[2.6.4.3.1 項][2.6.5.4.1 項]、マウスで ISL は初回通過効果を受けることが示唆された。ISL の主な消失経路は尿中排泄であり、投与量の約42.5%が未変化体として尿中に排泄された。M4へ

の酸化的脱アミノ反応も重要な消失経路であり、投与量の約25.5%が M4として尿中に排泄された。ISL の直接グルクロン酸抱合体である M7は尿中に僅かに検出された。ISL 及び M4はともにマウス血漿中の主要成分であり、それぞれ総血漿中放射能の61%及び21%に相当した。また、マウスでは HRMS で同定することのできない少量の代謝物が認められ、血漿中では総血漿中放射能の11%、尿中では投与量の1.4%を占めていた[2.6.5.12.1 項]。これらの結果から、マウスにおける ISL の主な消失経路は ISL の尿中排泄であり、酸化的脱アミノ反応による代謝も ISL の消失において重要な役割を果たしていることが示された。

2.6.4.5.1.2 ラットにおける in vivo 代謝

無処置及び胆管カニュレートした雄性 WH ラットに[^{3}H]ISL を5 mg/kg で経口投与し、ISL の代謝を検討した。投与放射能の73.7%が尿中に排泄されたが、胆汁中及び糞中への排泄はそれよりも少量で、排泄率はそれぞれ投与放射能の8.3%及び4.7%であった[2.6.5.15.3 項]。尿中と胆汁中を合わせ高い排泄率が示されたことから、ラットで ISL の吸収は良好であることが示され、この結果は PK 試験で得られたバイオアベイラビリティと一貫していた[2.6.4.3.2 項][2.6.5.4.1 項]。ISL の消失には、M4への酸化的脱アミノ反応による代謝が主要な役割を担っており、投与量の43.1%に相当する M4が尿中に排泄された。また、ISL の直接グルクロン酸抱合体である M6が胆汁中に認められ、その排泄量は投与量の2.6%に相当した。胆汁中に認められた M1、M2、M3及び M5を含む M4の複数のグルクロン酸抱合体は二次代謝物であり、これらを併せると投与量の2.4%を占めた。M4は胆汁中では微量代謝物として投与放射能の0.1%を占めた。尿中排泄も ISL の消失に寄与しており、投与量の22.3%が未変化体として尿中に排泄された[2.6.5.12.1 項]。

[^{3}H]ISL を無処置ラットに経口投与した際、放射化学分析及び HRMS 解析により同定された血漿中の薬物関連物質は ISL、M4及び M1のみであり、M4の血漿中濃度は ISL と同程度であった[2.6.5.12.1 項]。

結論として、ラットにおける ISL の主な消失経路は酸化的脱アミノ反応による代謝であり、未変化体の腎排泄も消失に寄与すると考えられた。

2.6.4.5.1.3 ウサギにおける in vivo 代謝

無処置雌性 Dutch Belted ウサギに[^{14}C]ISL を5 mg/kg の用量で経口投与し、ISL の代謝を検討した。投与放射能の大部分（60.3%）は尿中に排泄され、ウサギでも ISL の吸収は良好であることが示された[2.6.5.15.2 項]。尿中には主に未変化体として排泄され（投与量の30.2%）、尿中の主要代謝物は M4で、投与量の25.3%を占めた。ISL の直接グルクロン酸抱合体である M8及び酸化代謝物 M9は少量ながら尿中に検出され、それぞれ投与量の1.2%及び0.6%であった。また、ISL の2つの直接グルクロン酸抱合体 M6及び M7は HRMS 分析でのみ、尿中に微量検出された。投与後0～24時間のプール血漿中で、ISL、M4及び M8は血漿中総放射能のそれぞれ76%、18%及び4%を占めた。

代謝物 M6、M7及び M9は HRMS 分析でのみ微量に検出された。マウスと同様に、尿中試料のラジオクロマトグラムに未同定の成分が認められ、投与量の1.8%を占めていた。未同定の成分は血漿中でも投与後1時間で認められた[2.6.5.12.1 項]。

これらの結果から、ウサギにおける ISL の消失には、ISL の腎排泄と主に酸化的脱アミノ反応による代謝が同程度関与していることが示され、マウス、ラット及びサルでも ISL の消失に主として腎排泄と代謝が関与していることと一貫していた[2.6.4.5.1.1 項][2.6.4.5.1.2 項][2.6.4.5.1.4 項]。

2.6.4.5.1.4　サルにおける in vivo 代謝

胆管カニュレートした雄性アカゲザルに[^{3}H]ISL を10% Tween 80溶液として5 mg/kg の用量で経口投与し、ISL の代謝を検討した。

経口投与後、投与放射能の大部分（46.6%）が尿中に排泄され、糞中にも投与放射能の多くが排泄された（投与量の31.0%）が、胆汁中の排泄量は少量（投与量の3.6%）であった[2.6.5.15.4 項]。尿中に排泄された主要成分は未変化体であり、投与量の34.3%を占めた。M4は尿中及び糞中に排泄された主要代謝物であり、それぞれ投与量の5.2%及び28.3%であった。尿中では ISL のグルクロン酸抱合体2種（M6及び M7）も少量ながら検出され、それぞれ投与量の4.8%及び0.9%であった[2.6.5.12.1 項]。尿中に排泄された放射能及び糞中に検出された代謝物から、腸管での代謝が吸収を制限している可能性はあるが、サルにおける ISL の吸収は良好であることが示された。

サル血漿試料の放射化学的分析では識別可能なピークは認められなかったが、同じ試料を LC-HRMS 分析したところ、ISL 及び M4の両方が同定され、サルにおける血中の主要成分は ISL であることが示唆された[2.6.5.12.1 項]。さらに、サル毒性試験における血漿中 M4濃度は、予定臨床推奨用量である ISL 0.25 mg をヒトに投与した際と比べ顕著に高いことが示された[2.6.6.8.5 項]。

この試験の結果から、サルにおける ISL の消失には酸化的脱アミノ反応による代謝と未変化体の尿中排泄が同程度関与しており、酸化的脱アミノ反応は初回通過代謝にも関与する可能性が示された。

非臨床動物種での in vivo 代謝試験により、ISL の主要な代謝経路は M4への酸化的脱アミノ反応であり、グルクロン酸抱合はマイナーな代謝経路であることが示された。また、未変化体の腎排泄も非臨床動物種にわたって ISL の消失に関与していた。これらの結果は、健康被験者に[^{14}C]ISL 10 mg を経口投与したヒト AME 試験の結果と同様で、AME 試験では、尿中の主要な ISL 関連物質は M4であり（投与量の53%）、微量のグルクロン酸抱合体 M6及び M7が尿中に検出された。また、ISL 未変化体として投与量の32%が排泄されたことから、未変化体の直接的な尿中への排泄も ISL の消失に関与していることが示された[2.7.2.2.1.5 項]。血漿中の主要な ISL 関連物質は ISL と M4で、血漿中総放射能のそれぞれ58%及び31%を占めていた[2.7.2.2.1.5 項]。

2.6.4.5.1.5 マウス、ラット及びサル長期安全性試験における血漿中の M4の評価

マウス、ラット及びサルの毒性試験で得られた血漿中 M4濃度を、臨床試験の血漿中 M4濃度と探索的に比較した[2.6.5.12.3 項]。マウス（3ヵ月間）、ラット（6ヵ月間）及びサル（9ヵ月間）に ISL を3ヵ月以上反復経口投与した非臨床毒性試験で採取した投与後0～24時間（マウス及びラット）又は投与後0～72時間（サル）の血漿試料を AUC に比例するようにプールした。これらの動物の血漿試料を、健康被験者に ISL 5 mg を42日間1日1回経口投与した際（009試験）の投与1日目と42日目の投与後0～24時間の血漿試料（AUC に比例するようにプール）と比較した[2.6.5.12.2 項]。比較に際して、プール血漿試料中の濃度を、ISL 及び合成した M4の標準品を用いて半定量的 LC-HRMS 法で測定した。その結果、ヒト血漿中で認められた代謝物は M4のみであり、投与1日目及び42日目において、血漿中の ISL 関連物質のそれぞれ約31%及び37%を占めていた[2.6.5.12.2 項]。非臨床試験試料の測定の結果、マウス、ラット及びサルを用いた反復経口投与毒性試験において無毒性量で投与した際の血漿中 M4濃度は167～601 nM で、ヒト血漿試料中 M4濃度よりも高かった[表 2.6.4-11][2.6.5.12.3 項]。毒性試験で無毒性量を投与した際に動物で認められた血漿中 M4濃度は、予定臨床推奨用量である ISL 0.25 mg をヒトに投与した際と比べ高く、少なくとも223倍であった[2.6.6.8.5 項]。

表 2.6.4-11 マウス、ラット、サル及びヒトに ISL を反復投与した際の血漿中 M4 濃度

Species	ISL Dose	M4 (nM)
Human[a]	5 mg/day	15
Mouse (CD-1)[b]	45 mg/kg/day (NOAEL)	601
Mouse (RasH2 WT)[b]	18 mg/kg/day (NOAEL)	411
Rat[b]	10 mg/kg/day (NOAEL)	577
Monkey[b]	20 mg/kg/dose (NOAEL)	167

AUC=area under the concentration-time curve; C_{avg}=average concentration; EM=exposure multiple; h=hour(s); ISL=islatravir; NOAEL=no observed adverse effect level; p=protocol number; QD=once daily; t=time.

Note: All samples were pooled in an AUC-proportional manner so that the measured M4 concentration represented a C_{avg} and was proportional to its exposure calculated from t=0 to the last time point (24 h for mouse and rat and 72 h for monkey).

Note: EMs were determined using the average M4 concentration for the 0.25 mg QD dose of ISL that was calculated to be 0.75 nM assuming that the M4 average concentration of 15 nM for the 5 mg/day dose is dose proportional to the 0.25 mg QD dose (15 nM × 0.25 mg/day ÷ 5 mg/day=0.75 nM) [Sec. 2.6.6.8.5].

[a] Plasma samples obtained from healthy volunteers in clinical protocol P009 following 42 days of daily dosing at 5 mg were pooled from 0 to 24 h in an AUC-proportional manner [Sec. 2.7.2.2.1.3].

[b] Plasma samples obtained from mouse, rat, and monkey toxicity studies were pooled in an AUC-proportional manner and compared with AUC-pooled human plasma obtained from P009.

[2.6.5.12.3 項]

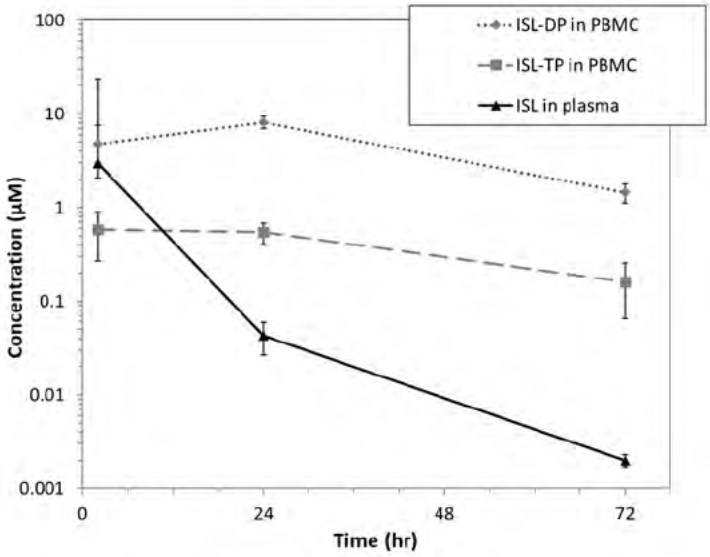
2.6.4.5.1.6　In vivo における PBMC 中の ISL 及びそのリン酸化同化物の細胞内濃度

2.6.4.5.1.6.1　ラット単回経口投与後の PBMC 中の ISL 及びそのリン酸化同化物の細胞内濃度の評価

雄性 WH ラット（12匹）に ISL を30 mg/kg の用量で単回経口投与し、ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の PBMC 中における細胞内濃度を評価した。血液試料を投与後2、24、72及び168時間（各時点で3匹）で採取し、血漿中 ISL 並びに PBMC 中の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP 濃度を LC-MS/MS 法で測定した[2.6.5.12.4 項]。

ラット血漿中の投与後2時間の ISL 濃度は3 µM であり、その後二相性の消失を示した[図 2.6.4-4][2.6.5.12.4 項]。ラット PBMC 中の投与後2時間の ISL 濃度は66 µM であり、その後の測定時点では定量下限未満であった。ISL-MP に関しては、本試験の全ての時点において定量下限未満で、ISL-DP 及び ISL-TP の PBMC 中濃度は投与後72時間まで測定可能で、投与後168時間で定量下限未満まで減少した。ラット PBMC 中における ISL-DP 及び ISL-TP の t1/2はそれぞれ20時間及び25時間と推定され、PBMC 中の ISL のリン酸化同化物の濃度は血漿中の ISL に比べて長期間、そして高濃度で維持されることが示された[図 2.6.4-4]。

図 2.6.4-4　ラット単回経口投与後の血漿中 ISL 並びに PBMC 中 ISL-DP 及び ISL-TP の濃度推移



DP=diphosphate; hr=hour(s); ISL=islatravir; n=number; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; PO=oral(ly); TP=triphosphate.

Note: Data represent mean ± standard deviation of n=3 subjects per time point.

Note: Concentrations in units of pmol/10^6 PBMCs were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.
[2.6.5.12.4 項]

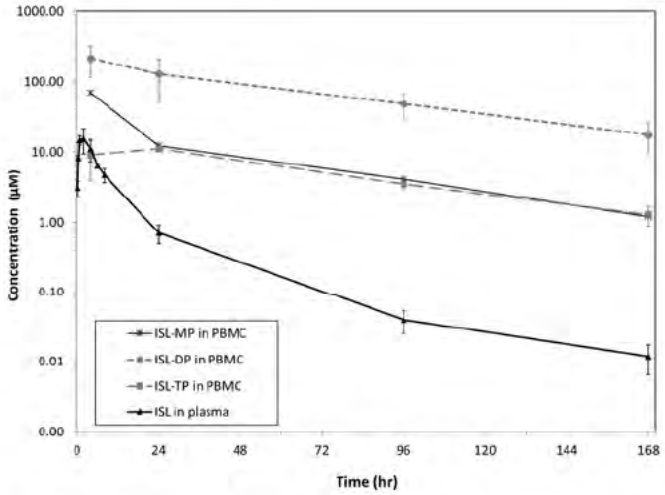
本結果より、ラット PBMC への ISL の良好な取込み及び PBMC 中での効率的な同化が示された。また、ISL-DP の Tmax が遅かったことから示唆されるように、ISL-DP 及び ISL-TP へのリン酸化は、細胞内でのリン酸化同化物間で平衡状態を確立する際に生じる時間依存的な過程である可能性が示唆された。[図 2.6.4-4]の結果を踏まえると、ラットにおける細胞内リン酸同化物と細胞外 ISL は、投与後2～24時間に平衡状態を確立することが示唆された。

2.6.4.5.1.6.2　サル単回経口投与後の PBMC 中の ISL 及びそのリン酸化同化物の細胞内濃度の評価

サル3匹に ISL を50 mg/kg の用量で単回経口投与し、ISL 及びそのリン酸化同化物の PBMC 中における細胞内濃度を評価した。投与後168時間まで連続的に血液試料を採取し、血漿及び PBMC 試料を調製した。血漿中の ISL 並びに PBMC 中の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP を LC-MS/MS 法で測定した[2.6.5.12.4 項]。

投与後の ISL は速やかに吸収され、血漿中 ISL の Tmax は1.3時間、Cmax は16.5 µM であった。その後、血漿中 ISL 濃度は多相性の消失を示した。サルにおける ISL の PBMC への取込み及び PBMC 中での同化は効率的であり、投与後4時間の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度はそれぞれ約6、70、220及び10 µM であった[図 2.6.4-5]。投与後24～168時間の濃度推移が PBMC 中のリン酸化体間でほぼ並行して推移しており、ISL-TP は投与後24時間までには平衡状態に到達していると考えられた[図 2.6.4-5]。PBMC 中の ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP 同化物の見かけの t1/2はそれぞれ約21、48及び49時間であり、PBMC 中の ISL のリン酸化体濃度は血漿中 ISL 濃度よりも高い濃度で持続することが示された[図 2.6.4-5][2.6.5.12.4 項]。

図 2.6.4-5 サル単回経口投与後（50 mg/kg）の血漿中 ISL 並びに PBMC 中 ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の濃度推移



DP=diphosphate; hr=hour(s); ISL=islatravir; MP=monophosphate; n=number; PO=oral(ly); PBMC=peripheral blood mononuclear cell; TP=triphosphate.

Note: Data represent mean ± standard deviation of n=3 subjects per time point.

Note: Concentrations in units of pmol/10^6 PBMCs were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.
[2.6.5.12.4 項]

本結果より、ラットと同様に、サルにおける PBMC への良好な取込み及び PBMC 中での効率的な同化が確認された。検討した全ての時点で、サル PBMC 中における ISL の総薬物関連物質濃度は血漿中 ISL 濃度よりも顕著に高かった。PBMC における ISL-TP の Tmax は血漿中 ISL の Tmax よりも遅いことから、ISL の ISL-TP へのリン酸化は時間依存的な過程であることが示唆された。[図 2.6.4-5]の結果を踏まえると、サルにおける細胞内リン酸同化物と細胞外 ISL は、投与後4～24時間に平衡状態を確立していることが示唆された。

2.6.4.5.1.6.3 ISL の毒性試験における ISL 及びそのリン酸化同化物の PBMC 中濃度の評価

マウス、ラット及びサルの反復経口投与毒性試験で ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の PBMC 中濃度を測定した。ISL-TP 濃度は概して ISL-MP 及び ISL-DP 濃度よりも高く、ISL の投与量の増加に伴い ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP 濃度は増加した[2.6.6.3.2 項][2.6.6.3.3 項][2.6.6.8.2 項][2.6.6.8.7 項]。

2.6.4.5.2 In vitro 代謝

2.6.4.5.2.1 ラット、サル及びヒトの肝細胞と腸管 S9画分における ISL の in vitro 代謝

非臨床動物種及びヒトの肝細胞と腸管 S9画分を用いて[^{3}H]ISL の in vitro 代謝を検討したとこ

ろ、いずれの動物種においても ISL の代謝率は低かった[2.6.5.13.1 項][2.6.5.13.2 項]。

ラット及びサルの肝細胞では ISL の代謝物が僅かに認められ、両動物種で直接グルクロン酸抱合体（M6）、サルの肝細胞で直接グルクロン酸抱合体（M7）が検出された。ヒト肝細胞では代謝物は検出されなかった。

ラット、サル及びヒトの腸管 S9画分中で[^{3}H]ISL をインキュベートしたところ、酸化的脱アミノ反応により M4が生成したが、その代謝速度は遅かった[2.6.5.13.2 項]。

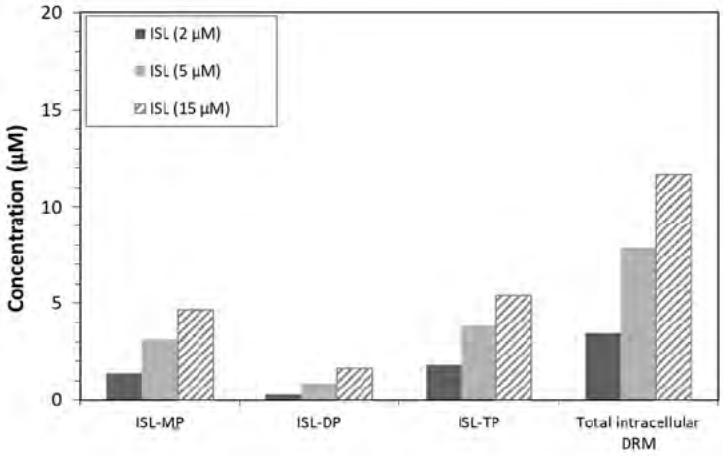
2.6.4.5.2.2　ラット、サル及びヒト肝細胞における ISL の in vitro 取込み及び同化

ラット、サル及びヒト肝細胞を用いた in vitro 試験を実施し、ISL（2～100 μM）の取込み及びリン酸化による同化物 ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の生成、並びにこれらの取込み及びリン酸化の濃度依存性を評価した[2.6.5.13.4 項]。ISL の細胞内濃度は細胞外 ISL 濃度の増加に比例して増加したことから、肝細胞への ISL の取込みは100 μM まで飽和しないことが示唆された。

2.6.4.5.2.3　マウス、サル及びヒト PBMC における ISL の in vitro 取込み及び同化

PBMC における ISL の取込みと同化を、マウス、サル及びヒトの新鮮血を用いて、ISL（2～15 μM）とインキュベートすることにより、in vitro 試験で評価した[2.6.5.13.5 項][2.6.5.13.6 項]。マウスにおける ISL の PBMC への取込み及び PBMC 中での同化は測定可能であり、各同化物（ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP）の細胞内濃度は ISL の細胞外濃度よりも低かった[図 2.6.4-6]。サル及びヒトの PBMC 中への ISL の取込みと PBMC 中での同化は効率的であり、細胞内の各同化物（ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP）濃度は細胞内外の ISL 濃度よりも高かった[図2.6.4-7] [図2.6.4-8]。マウス、サル及びヒトの PBMC 中において、ISL 関連物質のうち ISL-TP の濃度が最も高かった。ISL 関連物質の総細胞内濃度は細胞外 ISL 濃度の増加に伴って増加したが、5 μM を超える細胞外 ISL 濃度ではその増加比を下回った ISL 関連物質の総細胞内濃度の増加がみられた[2.6.5.13.5 項][2.6.5.13.6 項]。

図 2.6.4-6　PBMC 中の ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度
（マウス新鮮血とのインキュベーション）

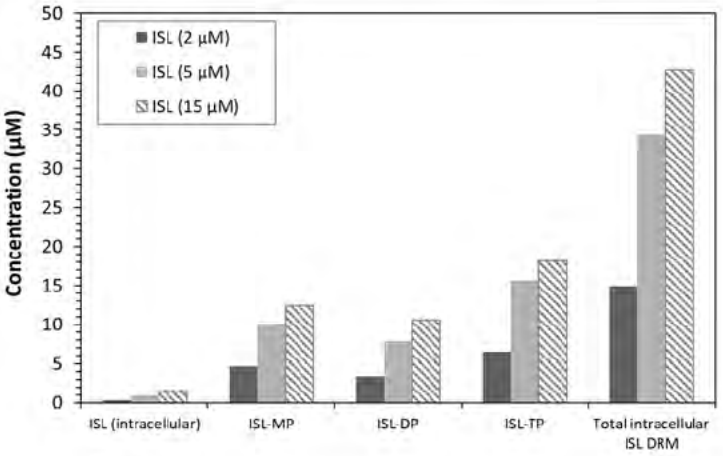


DP=diphosphate; DRM=drug related material; ISL=islatravir; MP=monophosphate; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; TP=triphosphate.

Note: Concentrations in units of pmol/10^6 PBMCs were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.

[2.6.5.13.5 項]

図 2.6.4-7　PBMC 中の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度
（サル新鮮血とのインキュベーション）

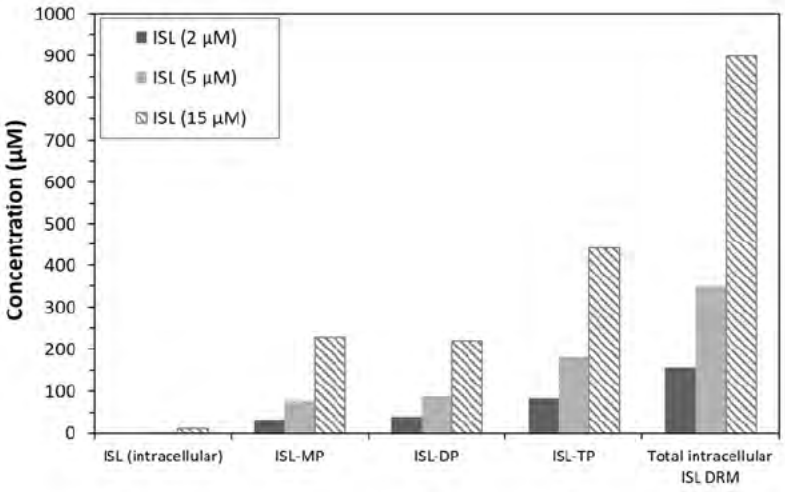


DP=diphosphate; DRM=drug related material; ISL=islatravir; ISL (intracellular)=measured intracellular concentration of ISL in PBMCs; MP=monophosphate; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; TP=triphosphate.

Note: Concentrations in units of pmol/10^6 PBMCs were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.

[2.6.5.13.6 項]

図 2.6.4-8 PBMC 中の ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度
（ヒト新鮮血とのインキュベーション）



DP=diphosphate; DRM=drug related material; ISL=islatravir; ISL (intracellular)=measured intracellular concentration of ISL in PBMCs; MP=monophosphate; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; TP=triphosphate.

Note: Concentrations in units of pmol/10^6 PBMCs were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.

[2.6.5.13.6 項]

In vitro における PBMC への ISL の取込みはマウスやサルよりもヒトで効率的であり、ISL 関連物質の総 PBMC 中濃度はマウス及びサルと比較してヒトで約10～50倍高かった。また、in vivo でも ISL の取込みにサルとヒトの間で種差が認められ、ヒトでの取込みはより効率が高いため、サルの病態モデル[2.6.2.2.3 項]において細胞内 ISL-TP の目標濃度の達成に要する用量よりも低い用量で、ヒトは目標濃度を達成する。PBMC 中の ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP 間の濃度比は、検討した ISL 濃度範囲でマウス、サルとヒトの間で一貫していたことから、ISL の取込みに種差はあるが、取込み後の細胞内キナーゼを介したリン酸化には種差がないことが示唆された[2.6.5.13.5 項][2.6.5.13.6 項]。

2.6.4.5.2.4 サル及びヒト PBMC 中における ISL 同化物の凍結融解安定性の in vitro 評価

PBMC 中の ISL-TP の安定性を in vitro で評価するため、ISL をサル及びヒトの新鮮血と2時間インキュベートし、PBMC 試料を分離した。最終的な PBMC の懸濁試料を2つに分け、1つは直ちに分析し、もう1つは-70℃で凍結保存し、融解後に安定性評価のため分析した。ISL、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度は LC-MS/MS 法により測定した[2.6.5.13.6 項]。

未凍結（調製直後）と凍結融解後のサル PBMC を測定した結果、凍結融解を1回行った PBMC 中で、ISL-MP 及び ISL-DP の濃度増加を伴う ISL-TP の分解が認められ、凍結融解により PBMC 中の ISL-TP 濃度はサルで約1/5倍、ヒトで約1/2倍に減少した[2.6.5.13.6 項]。ISL-MP と ISL-DP で

みられた濃度増加はこれらの同化物が凍結融解によって分解せず、安定であることを示唆している。また、未凍結及び凍結融解後のヒト PBMC の間で細胞内の ISL 濃度の変化は僅かで、凍結融解により ISL-TP が完全に分解し、ISL の生成に影響することは限定的であることが示唆された[2.6.5.13.6 項]。

PBMC 試料を凍結する前にメタノール／水混合液［70%（v/v）］で再懸濁させることにより、PBMC 中の細胞内 ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP は安定した。この条件下では、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP は凍結融解を繰り返しても安定であり、加水分解しない[2.6.5.13.6 項]。ISL の開発中に実施した GLP 適用の毒性試験及び臨床試験では、このような PBMC 試料のメタノールによる安定化を施した。

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 マウスにおける排泄

2.6.4.6.1.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄

無処置の雄性 CD-1マウスに非標識の ISL（1 mg/kg）を静脈内投与した際、未変化体の LC-MS/MS での定量結果に基づくと、投与後0～24時間の ISL の尿中排泄率は投与量の約61%であった[2.6.5.15.1 項]。この結果はマウスで腎排泄が ISL の主要な消失経路であることを示している[表 2.6.4-12]。

表 2.6.4-12 マウスに ISL 又は[^{14}C]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄

Dose (mg/kg)	Route	Percent of Administered Dose				
		Bile	Urine	Feces	Cage Wash	Total
1	IV[a]	NA	61[b]	NA	NA	NA
5	PO[c,d]	NC	70.9[e]	4.9[e]	2.7[e]	78.5[e]

CLp=plasma clearance; CLr=renal clearance; ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LSC=liquid scintillation counting; n=number; NA=not applicable; NC=not collected; PO=oral(ly).

Note: Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[a] IV administration of ISL.

[b] Percent excreted in urine=CLr/CLp × 100.

[c] PO administration of [^{14}C]ISL.

[d] Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[e] Values represent recovery in pooled excreta and cage wash from n=3 subjects.

[2.6.5.15.1 項][2.6.5.15.2 項]

2.6.4.6.1.2 [^{14}C]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス

無処置の雄性 CD-1マウスに[^{14}C]ISL（5 mg/kg）を経口投与した際、投与後72時間までに投与量の78.5%が回収され、その内訳は尿中に70.9%、糞中に4.9%及びケージ洗浄液中に2.7%であった[表

2.6.4-12][2.6.5.15.2 項]。これらの結果は、静脈内投与後のマウスにおける腎排泄と一貫しており[2.6.4.6.1.1 項]、マウスにおける主要な消失経路は腎排泄であることが更に支持された。

2.6.4.6.2 ラットにおける排泄

2.6.4.6.2.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄

無処置の雄性 WH ラットに非標識 ISL（1 mg/kg）を静脈内投与した際、未変化体の LC-MS/MS での定量結果に基づくと、投与後0～24時間の ISL の尿中排泄率は投与量の約18%であった[表 2.6.4-13][2.6.5.15.1 項]。この結果はラットで腎排泄が ISL の消失に関与していることを示している。

表 2.6.4-13 ラットに ISL 又は[^{3}H]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄

Dose (mg/kg)	Route	Percent of Administered Dose				
		Bile	Urine	Feces	Cage Wash	Total
1	IV[a]	NA	18[b]	NA	NA	NA
5	PO[c,d,e]	8.3 ± 3.3	73.7 ± 15.9	4.7 ± 1.0	4.4 ± 4.4[f]	91.1 ± 10.0

BDC=bile duct-cannulated; CLp=plasma clearance; CLr=renal clearance; ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LSC=liquid scintillation counting; n=number; NA=not applicable; PO=oral(ly).

Note: Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[a] IV administration of ISL to intact rats.

[b] Percent excreted in urine=CLr/CLp × 100.

[c] PO administration of [^{3}H]ISL to BDC rats.

[d] Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[e] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[f] Values reported for cage wash in rats represent the sum of recovery from cage wash and cage wipes.

[2.6.5.15.1 項][2.6.5.15.3 項]

2.6.4.6.2.2 [^{3}H]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス

胆管カニューレ処置した WH ラットに[^{3}H]ISL（5 mg/kg）を経口投与した際、投与後72時間までに投与放射能の91.1%が回収され、その内訳は胆汁中に8.3%、尿中に73.7%、糞中に4.7%及びケージ洗浄液中に4.4%であった[表 2.6.4-13][2.6.5.15.3 項]。ラットに ISL を静脈内投与した際の尿中未変化体排泄率[2.6.4.6.2.1 項]と比較して、本試験での尿中放射能排泄率の方が高かったことから、[^{3}H]ISL 関連物質の大部分は代謝物であることが示唆された[2.6.4.5.1.2 項][表 2.6.4-13]。

尿中代謝物のプロファイリングからもこの結論が支持され、尿中放射能の大部分は代謝物であり、未変化体としての排泄率は投与量の約22%であった[2.6.4.5.1.2 項][2.6.5.12.1 項]。この結果は、静脈内投与後の ISL の排泄率[2.6.4.6.2.1 項][2.6.5.15.1 項]ともよく一致した。

2.6.4.6.3 ウサギにおける排泄

2.6.4.6.3.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄

無処置の雌性 Dutch Belted ウサギに非標識 ISL（1 mg/kg）を静脈内投与した際、未変化体の LC-MS/MS での定量結果に基づくと、投与後0～48時間の ISL の尿中排泄率は投与量の約31%であった[表 2.6.4-14][2.6.5.15.1 項]。この結果はウサギで腎排泄が ISL の消失に関与していることを示している。

表 2.6.4-14 ウサギに ISL 又は[^{14}C]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄

Dose (mg/kg)	Route	Percent of Administered Dose				
		Bile	Urine	Feces	Cage Wash	Total
1	IV[a]	NA	31[b]	NA	NA	NA
5	PO[c,d,e]	NC	60.3	6.2	6.1	72.6

CLp=plasma clearance; CLr=renal clearance; ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LSC=liquid scintillation counting; n=number; NA=not applicable; NC=not collected; PO=oral(ly).

Note: Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[a] IV administration of ISL.

[b] Percent excreted in urine=CLr/CLp × 100.

[c] PO administration of [^{14}C]ISL.

[d] Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[e] Values represent mean of n=2.

[2.6.5.15.1 項][2.6.5.15.2 項]

2.6.4.6.3.2 [^{14}C]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス

無処置の雌性 Dutch Belted ウサギに[^{14}C]ISL（5 mg/kg）を経口投与した際、投与後72時間までに投与放射能の72.6%が回収され、その内訳は尿中に約60.3%、糞中に約6.2%及びケージ洗浄液中に約6.1%であった[表 2.6.4-14][2.6.5.15.2 項][2.6.4.5.1.3 項]。ウサギに ISL を静脈内投与した際の尿中未変化体排泄率[2.6.4.6.3.1 項]と比較して、本試験での尿中放射能排泄率の方が高かったことは、尿中に代謝物が認められたことと一貫していた[2.6.4.5.1.3 項][表 2.6.4-14]。尿中代謝物のプロファイリングの結果から、投与放射能の30.2%が未変化体として排泄されたことが示され[2.6.4.5.1.3 項][2.6.5.12.1 項]、静脈内投与後の尿中 ISL 排泄率[2.6.4.6.3.1 項][2.6.5.15.1 項]ともよく一致した。

2.6.4.6.4 サルにおける排泄

2.6.4.6.4.1 ISL 単回静脈内投与後の ISL の腎排泄

無処置の雄性アカゲザルに非標識 ISL（1 mg/kg）を静脈内投与した際、未変化体の LC-MS/MS での定量結果に基づくと、投与後0～24時間の ISL の尿中排泄率は投与量の約51%であった[表 2.6.4-15][2.6.5.15.1 項]。この結果は、サルでの ISL の主要な消失経路は腎排泄であることを示している。

表 2.6.4-15　サルに ISL 又は[^{3}H]ISL をそれぞれ単回静脈内又は経口投与した際の排泄

Dose (mg/kg)	Route	Percent of Administered Dose				
		Bile	Urine	Feces	Cage Wash	Total
1	IV[a]	NA	51[b]	NA	NA	NA
5	PO[c,d,e]	3.6 ± 1.7	46.6 ± 8.7	31.0 ± 8.3	1.2 ± 0.3	82.4 ± 2.4

BDC=bile duct-cannulated; CLp=plasma clearance; CLr=renal clearance; ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LSC=liquid scintillation counting; n=number; NA=not applicable; PO=oral(ly).

Note: Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[a] IV administration of ISL to intact monkeys.

[b] Percent excreted in urine=CLr/CLp × 100.

[c] PO administration of [^{3}H]ISL to BDC monkeys.

[d] Total recovery of radioactivity was determined by LSC.

[e] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[2.6.5.15.1 項][2.6.5.15.4 項]

2.6.4.6.4.2　[^{3}H]ISL 単回経口投与後の排泄及びマスバランス

胆管カニューレ処置した雄性アカゲザルに[^{3}H]ISL（5 mg/kg）を経口投与した際、投与後120時間までに投与放射能の82.4%が回収され、その内訳は胆汁中に3.6%、尿中に46.6%、糞中に31.0%及びケージ洗浄液中に1.2%であった[表 2.6.4-15][2.6.5.15.4 項]。サルでは、投与放射能の約34%がISL として尿中に排泄された[2.6.4.5.1.4 項][2.6.5.12.1 項]。静脈内投与後の尿中未変化体排泄率[2.6.4.6.4.1 項]と一貫して、腎排泄がサルでのISL の主要な消失経路であることが更に支持された。

2.6.4.6.5　ラットの乳汁中への ISL の排泄

ISL の乳汁中への排泄は検討しなかった。

出生後ラットを用いた経口投与トキシコキネティクス試験（TT#[redacted]-7100）では、母ラットに ISL を10 mg/kg/日で（妊娠6日目から授乳10日目まで）投与した。授乳10日目における仔ラットの ISL 濃度は、母ラットの投与後1時間及び3時間の血漿中濃度のそれぞれ0.1%及び1.5%であった[2.6.7.17D 項]。仔ラットの血漿中に ISL が存在していたことから、ISL はラットの乳汁中に排泄されることが示された。

2.6.4.6.6　マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける M4の排泄

雄性 CD-1マウス、雄性 WH ラット、雌性 Dutch Belted ウサギ及び雄性アカゲザルに ISL の代謝物である M4（1 mg/kg）を急速静脈内投与した際の M4の排泄を検討した[2.6.5.15.5 項]。マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける M4の尿中未変化体排泄率はそれぞれ投与量の約53%、77%、63%及び54%であった[表 2.6.4-16]。これらの結果から、非臨床動物種での M4の主要な消失経路は腎排泄であることが示された。

表 2.6.4-16 マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける M4 の尿中排泄率

Species	Dose (mg/kg)	Route	Percent of Administered Dose Excreted in Urine[a,b]
Mouse	1[c]	IV[d]	53
Rat	1[c]	IV[d]	77
Rabbit	1[c]	IV[d]	63
Monkey	1[c]	IV[d]	54

CLp=plasma clearance; CL_r=renal clearance; ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); n=number.

[a] Percent excreted in urine=CLr/CLp × 100.

[b] Values represent mean of n=3.

[c] Formulated in 30% captisol as a solution.

[d] IV administration of ISL metabolite M4 to intact animals.

[2.6.5.15.5 項]

2.6.4.7 薬物相互作用

2.6.4.7.1 ISL 及び M4の消失に関与する薬物代謝酵素とトランスポーター

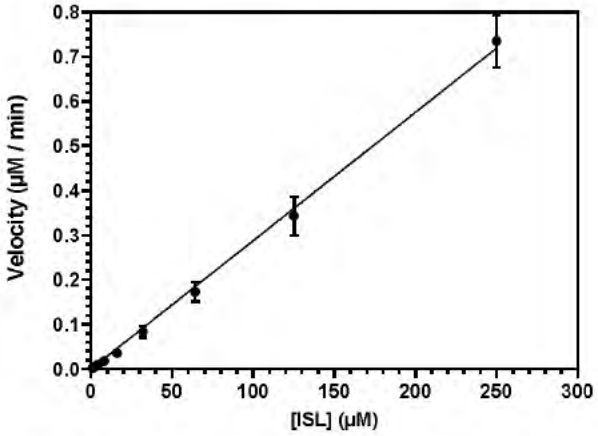
2.6.4.7.1.1 薬物代謝酵素

[2.6.4.5.2.1 項]で記載したように、ヒト肝細胞との標準的なインキュベーションを行った試料中に代謝物が検出されなかったことから、ISL は CYP により代謝されないと考えられる。また、ヒト尿中に微量の ISL のグルクロン酸抱合体が検出されたが、ISL の全体的な消失への寄与は僅かであった。よって、CYP 又は UGT の阻害剤又は誘導剤が ISL の薬物動態に影響を及ぼす可能性は低い。

2.6.4.7.1.1.1 発現系ヒト ADA による ISL の in vitro 代謝

発現系ヒト ADA を用いて ISL の in vitro 代謝を評価したところ、比較的遅い代謝速度で M4が生成した[2.6.5.13.3 項]。これは、2-フルオロアデニン誘導体が ADA を介した代謝の感受性を低下させるという報告[4.3: 04LT7Y]と一貫していた。発現系ヒト ADA による in vitro 代謝で得られた結果は、ヒト腸管 S9画分で M4の生成が認められたが、ヒト肝細胞では認められなかったこと[2.6.4.5.2.1 項]とも一貫している。つまり、この違いは肝臓に比べて腸内の ADA 量が多いこと[4.3: 07WFC7][4.3: 07WFDT]に起因しており、発現系ヒト ADA を用いた速度論的試験では、ISL 250 µM まで見かけの生成速度は線形性を示し[図 2.6.4-9]、ISL の酸化的脱アミノ反応は K_m 値が250 µM を超える高い代謝能を有する過程であることが示された[2.6.5.16.1 項]。

図 2.6.4-9　　発現系ヒト ADA を介した ISL の酸化的脱アミノ反応による M4 の生成速度



ISL=islatravir; min=minute; n=number; rhADA=recombinant human adenosine deaminase.

Note: Data represent mean ± standard deviation (n=3).

[2.6.5.16.1 項]

ADA 阻害剤［例：ペントスタチン（抗白血病薬）］と ISL の併用は ISL の血漿中曝露量を増加させる可能性がある。

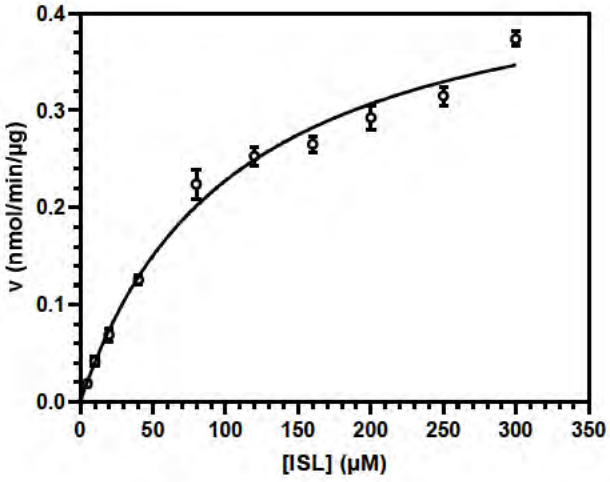
ヒト肝細胞及び PBMC における ISL の代謝は、検討した実験条件下では、ISL から ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP への細胞内における同化のみであった[2.6.5.13.4 項][2.6.5.13.6 項]。

2.6.4.7.1.2　　ISL のリン酸化における dCK の役割

2.6.4.7.1.2.1　　In vitro における発現系ヒト dCK による ISL のリン酸化

ISL から ISL-MP への最初のリン酸化は dCK によって触媒される[2.6.2.5.2 項]。発現系ヒト dCK を用いた酵素速度論的試験において、ISL は発現系ヒト dCK に対して親和性の低い基質であることが示された。ISL から ISL-MP へのリン酸化はミカエリス－メンテン型の速度論的変化を示し[図 2.6.4-10]、K_m 値は106 µM、V_{max} 値は0.47 nmol/min/µg であった。本試験の結果を[表 2.6.4-17]及び[2.6.5.17.1 項]に要約する。

図 2.6.4-10 発現系ヒト dCK による ISL のリン酸化における ISL-MP の生成速度



ISL=islatravir; min=minute; n=number; rhdCK=recombinant human deoxycytidine kinase.

Note: Data represent mean ± standard deviation (n=3).

[2.6.5.17.1 項]

表 2.6.4-17 発現系ヒト dCK による ISL、3TC 及び FTC のリン酸化に関する速度論的パラメータ

Kinetic Parameters			
Substrate	ISL	3TC	FTC
K_m (µM)[a]	106 ± 11	3.2 ± 0.2	2.4 ± 0.3
V_{max} (pmol/min/µg)[a,b]	470 ± 20	7.1 ± 0.08	15 ± 0.4
V_{max}/K_m (mL/min/µg)	0.0044	0.0022	0.0063

3TC=lamivudine; FTC=emtricitabine; ISL=Islatravir; K_m=Michaelis constant; min=minute(s); n=number; rhdCK=recombinant human adenosine deaminase; SE=standard error; V_{max}=maximum reaction velocity.

[a] Data represent mean ± SE of n=3 replicates.

[b] Experimental data reported in units of nmol/min/µg were converted to pmol/min/µg by multiplying experimental values by 1000.

[2.6.5.17.1 項][2.6.5.17.2 項]

2.6.4.7.1.2.2 In vitro における発現系ヒト dCK による3TC 及び FTC のリン酸化

dCK は HIV の NRTI である 3TC や FTC を含む種々の抗がん剤や抗ウイルス剤のリン酸化に関与する[2.6.2.5.2 項]。発現系ヒト dCK を用いた酵素速度論的試験において、3TC や FTC の K_m 値はそれぞれ 3.2 及び 2.4 µM であり、発現系ヒト dCK に対して親和性の高い基質であることが示された[表 2.6.4-17][2.6.5.17.2 項]。

2.6.4.7.1.2.3 3TC、FTC 及びエンテカビルによる ISL のーリン酸化の阻害

ISL、3TC 及び FTC の間で dCK の基質親和性に大きな違いが認められたことから[2.6.4.7.1.2.1 項][2.6.4.7.1.2.2 項]、dCK（ISL-MP の生成に関与）に対する3TC 及び FTC の阻害について評価した。これらの IC_{50}値はそれぞれ4.4及び2.5 µM であった[2.6.5.17.3 項]。これらの IC_{50}値は、dCK に対する3TC 及び FTC の低い K_m 値と一貫していた[2.6.5.17.2 項]。dCK の基質ではないエンテカビルでは200 µM まで ISL の一リン酸化を阻害せず、IC_{50}値は200 µM 超であることが示された[2.6.5.17.3 項]。これらの結果は、3TC、FTC 又は dCK の他の高親和性基質と併用した際に、ISL が dCK を介した相互作用を受ける可能性を示唆している。3TC との臨床薬物相互作用試験で、ISL-TP の AUC は ISL を3TC の治療用量と併用した際に87%減少した[2.7.2.2.3.1.3 項]。

なお、M4に関する dCK による代謝試験は実施していない。

2.6.4.7.1.3 トランスポーター

LLC-PK1細胞及び MDCK II 細胞単層膜を用いて、in vitro における ISL の透過性を検討したところ、Papp は LLC-PK1細胞で$3.2～3.6\times10^{-6}$ cm/s、MDCK II 細胞で$1.6～2.2\times10^{-6}$ cm/s であった[2.6.5.18.1 項][2.6.5.18.3 項]。ISL の in vitro での透過性は低いが、in vivo での吸収は良好であった[2.6.4.6 項]。また、PBMC 中への取込みも良好で、能動的な取込みがあることが示唆される。

2.6.4.7.1.3.1 薬物トランスポーターの基質としての ISL の評価

2.6.4.7.1.3.1.1 P-gp 及び BCRP の基質としての ISL の評価

ヒト P-gp を安定的に発現させた LLC-PK1細胞を用いて ISL（0.1～1 µM）の双方向輸送を検討したが、ISL の受動的透過性が低く、ISL が P-gp の基質であるかどうかを正確に評価することができなかった[2.6.5.18.1 項]。[^{14}C]ISL（5 µM）の対照及びヒト P-gp を含む膜小胞への取込みを測定したところ、時間及び ATP 依存性は認められず[2.6.5.18.2 項]、ISL は P-gp の基質ではないことが示された。

ヒト BCRP を安定的に発現させた MDCK II 細胞を用いて、ISL（0.5～2 µM）の BCRP に対する基質認識性を評価したところ、BCRP 発現細胞では対照細胞と比較してより高い ISL の輸送が認められた。また、BCRP の典型的阻害薬である Ko143（5 µM）存在下では、BCRP を発現させた MDCK II 細胞における ISL の efflux ratio は0.3～0.9に減少したことから、ISL は BCRP の基質であることが示された[2.6.5.18.3 項]。

2.6.4.7.1.3.1.2 腎薬物トランスポーターの基質としての ISL の評価

MDCK II 細胞とヒト OAT1、OAT3又は MATE2K を安定的に発現させた MDCK II 細胞、及び CHO-K1細胞とヒト OCT2又は MATE1を安定的に発現させた CHO-K1細胞を用いて、[^{3}H]又は[^{14}C]ISL

（1～2 μM）の取込みを測定した[2.6.5.18.4 項][2.6.5.18.5 項][2.6.5.18.6 項][2.6.5.18.7 項][2.6.5.18.8 項]。検討した全ての薬物トランスポーターについて、トランスポーターを発現させた細胞株と対照となる親細胞株で ISL の取込みは同程度であったことから、ISL は OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2K の基質ではないことが示された。

2.6.4.7.1.3.1.3 ヌクレオシドトランスポーターの基質としての ISL の評価

MDCK Ⅱ細胞とヒト CNT1、CNT2、CNT3、ENT1又は ENT2を安定的に発現させた MDCKII細胞を用いて、[^{14}C]ISL（1～2 μM）の取込みを評価した[2.6.5.18.9 項][2.6.5.18.10 項][2.6.5.18.11 項][2.6.5.18.12 項][2.6.5.18.13 項]。CNT1、CNT2又は CNT3を発現させた MDCKII細胞への[^{14}C]ISL の取込みは時間依存的であり、対照の MDCKII細胞と比較して1.6～2.2倍（CNT1）、1.0～1.7倍（CNT2）、1.5～5.4倍（CNT3）に増加した。これらの細胞株への[^{14}C]ISL の取込みは、ヌクレオシドトランスポーター阻害薬であるゲムシタビン（300 μM、CNT1）又はアデノシン（100 μM、CNT2 及び CNT3）により部分的に阻害された[2.6.5.18.9 項][2.6.5.18.10 項][2.6.5.18.11 項]。検討条件下において、[^{14}C]ISL は CNT3の基質であり、CNT1及び CNT2の弱い基質である可能性が示唆された。ENT1又は ENT2を発現させた MDCKII細胞への[^{14}C]ISL の取込みは対照の MDCKII細胞と同程度であり、[^{14}C]ISL は ENT1及び ENT2の基質ではないことが示された[2.6.5.18.12 項][2.6.5.18.13 項]。

ヒト薬物トランスポーターの基質としての ISL の評価を要約すると、ISL は OAT1、OAT3、OCT2、MATE1、MATE2K 又は P-gp の基質ではないが、BCRP の基質であった。しかしながら、ヒト腎皮質での BCRP の発現は低く、腎の BCRP を介した臨床的に意味のある DDI の可能性は低いことが報告されており[4.3: 08RGJ3][4.3: 05LFJQ]、ISL の吸収は良好であり（吸収率は約91%）[2.7.2. 2.1.5 項]、胆汁中への排泄率は低いことも考慮すると、BCRP 阻害剤との薬物相互作用は起こらないと考えられる。また、ISL は CNT3の基質であり、CNT1及び CNT2の弱い基質である可能性が示唆されたが、ENT1及び ENT2の基質ではなかった。[2.6.4.4.6 項]で述べたように、ISL の PBMC 中への取込みには受動拡散とヌクレオシドトランスポーターによる輸送の両方が関与している。PBMC 中への ISL の取込みに複数の経路が関与していること、CNT を介した輸送は高い輸送能を有していること[4.3: 05R0PK][4.3: 05R0PT]、及び CNT を介した薬物間相互作用の報告がないことを考慮すると、PBMC 中への ISL の取込みにおいて臨床的に意味のある薬物相互作用は生じないと考えられる。

2.6.4.7.1.3.2 薬物トランスポーターの基質としての M4の評価

In vitro における M4の透過性を LLC-PK1細胞及び MDCK Ⅱ細胞単層膜を用いて評価した。M4 の Papp は LLC-PK1細胞で1.0～1.2×10^{-6} cm/s [2.6.5.18.14 項]、MDCK Ⅱ細胞で1.0×10^{-6} cm/s

[2.6.5.18.16 項]であった。

2.6.4.7.1.3.2.1 P-gp 及び BCRP の基質としての M4の評価

ヒト P-gp を安定的に発現させた LLC-PK1細胞を用いて、M4（0.1～1 μM）の P-gp に対する基質認識性を評価したが、M4の受動的透過性が低く、M4が P-gp の基質であるかどうかを正確に評価することができなかった[2.6.5.18.14 項]。M4（2 μM）の対照及びヒト P-gp を含む膜小胞への取込みを測定したところ、時間及び ATP 依存性は認められず[2.6.5.18.15 項]、M4は P-gp の基質ではないことが示された。

ヒト BCRP を安定的に発現させた MDCK II 細胞を用いて、M4（0.5～2 μM）の双方向輸送について検討したが、M4の受動的透過性が低く（Papp = 1.0×10^{-6} cm/s）、M4が BCRP の基質であるかどうかを正確に評価することができなかった[2.6.5.18.16 項]。M4（2 μM）の対照及びヒト BCRP を含む膜小胞への取込みを測定したところ、BCRP を含む膜小胞への取込みは時間及び ATP 依存的であり（ATP 存在下では非存在下の11～28倍に増加した）、この取込みは BCRP の典型的阻害薬である Ko143（10 μM）で阻害されたことから、M4は BCRP の基質であることが示された[2.6.5.18.17 項]。

2.6.4.7.1.3.2.2 腎薬物トランスポーターの基質としての M4の評価

MDCK II 細胞とヒト OAT1又は OAT3を安定的に発現させた MDCK II 細胞、HEK293細胞とヒト MATE2K を安定的に発現させた HEK293細胞、及び CHO-K1細胞とヒト OCT2又は MATE1を安定的に発現させた CHO-K1細胞を用いて、M4（2 μM）の取込みを測定した[2.6.5.18.18 項][2.6.5.18.19 項][2.6.5.18.20 項][2.6.5.18.21 項][2.6.5.18.22 項]。OAT3又は MATE2K を発現させた細胞への M4の取込みは時間依存的であり、対照細胞のそれぞれ63～171倍（OAT3）又は1.5～2.9倍（MATE2K）に増加した。また、これらの取込みは典型的な阻害薬であるプロベネシド（OAT3、1 mM）及びピリメタミン（MATE2K、5 μM）により、それぞれ阻害されたことから、M4は OAT3及び MATE2K の基質であることが示された[2.6.5.18.19 項][2.6.5.18.22 項]。OAT1を発現させた細胞への M4の取込みは対照細胞への取込みよりも大きかったが、この取込みは典型的な OAT1阻害剤であるプロベネシド（1 mM）によって阻害されず、非特異的であると考えられた[2.6.5.18.18 項]。OCT2及び MATE1を発現させた細胞での M4の取込みは、対照細胞と同程度であった[2.6.5.18.20 項][2.6.5.18.21 項]。これらの結果から、M4は OAT3及び MATE2K の基質であり、OAT1、OCT2及び MATE1の基質ではないことが示された。

以上、ヒト薬物トランスポーターに関して、M4は OAT1、OCT2、MATE1及び P-gp の基質ではないが、OAT3、MATE2K 及び BCRP の基質である。複数の薬物トランスポーター及び糸球体ろ過が M4の排泄に寄与していることから、薬物トランスポーターを介して M4との薬物相互作用が起

こる可能性は低いと考えられる。

2.6.4.7.2 ISL 及び M4による薬物代謝酵素とトランスポーターの阻害

2.6.4.7.2.1 ISL による薬物代謝酵素の阻害

ヒト肝ミクロソームにおいて、ISL は検討した主要な CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及び CYP3A）に対して可逆的な阻害作用を示さず、IC_{50}値は100 μM 超であった[2.6.5.19.1 項]。ISL はこれら CYP 分子種に対して時間依存的な阻害も示さなかった[2.6.5.19.3 項]。

ISL は UGT1A1及び UGT2B7を阻害せず、IC_{50}値は100 μM 超であった[2.6.5.20.1 項]。

薬物代謝酵素に対し ISL が薬物相互作用を引き起こす可能性についての評価には ISL 0.75 mg 単回投与時の ISL の血漿中 Cmax の実測値である0.025 μM（032試験）を用いた。この値は、予定臨床推奨用量である ISL 0.25 mg 投与時の血漿中 Cmax（母集団薬物動態解析により推定）よりも高く、薬物相互作用の可能性に関する保守的な評価となる。ICH M12ガイドラインに基づき算出した薬物相互作用のリスク評価に関するパラメータ値は、同ガイドラインで設定されている閾値よりも低く、少なくとも閾値に対し40倍のマージンを有していた[2.6.5.21 項]。これらの結果より、ISL による主要な CYP 分子種や UGT1A1及び UGT2B7の阻害を介した薬物相互作用が起こる可能性は低いと考えられる。

2.6.4.7.2.2 M4による薬物代謝酵素の阻害

ヒト肝ミクロソームにおいて、M4は検討した主要な CYP 分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及び CYP3A）に対して可逆的な阻害作用を示さず、IC_{50}値は100 μM 超であった[2.6.5.19.2 項]。M4はこれら CYP 分子種に対して時間依存的な阻害も示さなかった[2.6.5.19.4 項]。

M4は UGT1A1及び UGT2B7を阻害せず、IC_{50}値は100 μM 超であった[2.6.5.20.2 項]。

薬物代謝酵素に対し M4が薬物相互作用を引き起こす可能性についての評価には ISL 0.75 mg 単回投与時の M4の血漿中 Cmax の実測値である0.022 μM（032試験）を用いて保守的な評価を行った。ICH M12ガイドラインに基づき算出した薬物相互作用のリスク評価に関するパラメータ値は、同ガイドラインで設定されている閾値に対し、少なくとも50倍の大きなマージンを有していた[2.6.5.22 項]。これらの結果より、M4による主要な CYP 分子種や UGT1A1及び UGT2B7の阻害を介した薬物相互作用は起こらないと考えられる。

2.6.4.7.2.3 ISL による薬物トランスポーターの阻害

ヒト OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2K、P-gp、BCRP、

MRP2、MRP3及びMRP4に対するISLの阻害作用を、これらの薬物トランスポーターを安定的に発現させた細胞を用いて検討した。ISLのIC_{50}値を得るために複数のISL濃度で検討しており、その最高検討濃度は75～300 μMであった。各薬物トランスポーターのプローブ基質の濃度は報告されているK_m値よりも十分に低くしたため、競合的阻害を仮定するとIC_{50}値はK_i値と同程度である[表 2.6.4-18][2.6.5.23 項]。

表 2.6.4-18 種々の薬物トランスポーターに対するISLの阻害作用

Transporter	Probe Substrate	IC_{50} (μM)	Inhibition at Highest Concentration Tested
OATP1B1	[^{3}H] Pitavastatin (0.1 μM)	>300	No inhibition at 300 μM
OATP1B3	[^{3}H] Bromosulfophthalein (0.1 μM)	>300	2% inhibition at 300 μM
OCT1	[^{14}C] Metformin (10 μM)	>300	6% inhibition at 300 μM
OCT2	[^{14}C] Metformin (10 μM)	>100	15% inhibition at 100 μM
OAT1	[^{3}H] Cidofovir (1 μM)	>100	2% inhibition at 100 μM
OAT3	[^{3}H] Estrone sulfate (1 μM)	>100	31% inhibition at 100 μM
MATE1	[^{14}C] Metformin (5 μM)	>75	No inhibition at 75 μM
MATE2K	[^{14}C] Metformin (5 μM)	>75	3% inhibition at 75 μM
P-gp	[^{3}H] N-digoxin (0.1 μM)	>200	No inhibition at 200 μM
BCRP	[^{3}H] Methotrexate (10 μM)	>100	35% inhibition at 100 μM
MRP2	[^{14}C] Ethacrynic acid-glutathione conjugate (1 μM)	>100	10% inhibition at 100 μM
MRP3	[^{3}H] estradiol$_2$-17β-glucuronide (1 μM)	>100	6% inhibition at 100 μM
MRP4	[^{3}H] Folic acid (10 μM)	>100	No inhibition at 100 μM

BCRP=breast cancer resistance protein; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; MRP2=Multidrug resistance-associated protein 2; MRP3=multidrug resistance-associated protein 3; MRP4=multidrug resistance-associated protein 4; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; P-gp=P-glycoprotein.

[2.6.5.23 項]

ISL の予定臨床推奨用量である 0.25 mg 投与時の ISL の曝露量において、ISL は OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2K、P-gp、BCRP、MRP2、MRP3及びMRP4を阻害しないと考えられる。肝取込みトランスポーターである OATP1B1及び OATP1B3、腎トランスポーターである OCT2、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1及びMATE2K、並びに排出トランスポーターである P-gp 及びBCRP に関し、ICH M12ガイドラインに基づき、ISL を0.75 mg で単回経口投与した際の ISL の血漿中 Cmax の実測値である0.025 μM（032試験）を用いて、薬物相互作用のリスク評価に関するパラメータ値を算出した。この Cmax 値を用いたリスク評価は、ISL の予定臨床推奨用量である0.25 mg を1日1回投与した際の血漿中濃度よりも高く、保守的な評価である。評価の結果、ka の値は同ガイドラインで推奨する0.1 min^{-1}を用いたところ、同ガイドラインで設定されている閾値を大きく下回り、少なくとも閾値に対し50倍のマージンを有していた[2.6.5.24 項]。

肝取込みトランスポーターである OCT1の評価では、薬物相互作用の僅かなリスクが示唆されたが、in vitro の OCT1阻害データの臨床的意義を評価することは現在の知見では困難である[4.3: 05DSRY]。

以上のことから、検討した薬物トランスポーターを ISL が阻害することにより、臨床的に重要な薬物相互作用が起こるリスクは低いことが示された。

2.6.4.7.2.4 M4による薬物トランスポーターの阻害

ヒト OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2K、P-gp 及び BCRP に対する M4の阻害作用を、これらの薬物トランスポーターを安定的に発現させた細胞を用いて検討した。M4の IC_{50}値を得るために100 μM（P-gp の場合は50 μM）までの複数の M4濃度で検討した[表 2.6.4-19][2.6.5.25 項]。各薬物トランスポーターのプローブ基質の濃度は報告されている K_m値よりも十分に低くしたため、競合的阻害を仮定すると IC_{50}値は K_i値と同程度である。

表 2.6.4-19 種々の薬物トランスポーターに対する M4 の阻害作用

Transporter	Probe Substrate	IC_{50} (μM)	Inhibition at Highest Concentration Tested
OATP1B1	[^{3}H] Pitavastatin (0.1 μM)	>100	No inhibition at 100 μM
OATP1B3	[^{3}H] Bromosulfophthalein (0.1 μM)	>100	19% inhibition at 100 μM
OCT1	[^{14}C] Metformin (10 μM)	>100	4% inhibition at 100 μM
OCT2	[^{14}C] Metformin (10 μM)	>100	No inhibition at 100 μM
OAT1	[^{3}H] Cidofovir (1 μM)	>100	34% inhibition at 100 μM
OAT3	[^{3}H] Estrone sulfate (1 μM)	>100	30% inhibition at 100 μM
MATE1	[^{14}C] Metformin (5 μM)	>100	No inhibition at 100 μM
MATE2K	[^{14}C] Metformin (5 μM)	>100	No inhibition at 100 μM
P-gp	[^{3}H] N-digoxin (0.1 μM)	>50	No inhibition at 50 μM
BCRP	[^{3}H] Methotrexate (10 μM)	>100	No inhibition at 100 μM

BCRP=breast cancer resistance protein; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; P-gp=P-glycoprotein.

[2.6.5.25 項]

ISL の予定臨床推奨用量である0.25 mg 投与時の M4の曝露量において、M4は検討したいずれの薬物トランスポーターも阻害しないと考えられた。ISL を0.75 mg で単回経口投与した際の M4の血漿中 Cmax の実測値である0.022 μM（032試験）を用いて、保守的なリスク評価を行った。ISL と同様に、OATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1、MATE2K、P-gp 及び BCRP に関し、ICH M12ガイドラインに基づき薬物相互作用のリスク評価に関するパラメータ値を算出

した（ka の値は同ガイドラインの推奨値0.1 min^{-1}を用いた）ところ、同ガイドラインで設定されている閾値を大きく下回り、少なくとも閾値に対し33倍のマージンを有していた[2.6.5.26 項]。

以上のことから、検討した薬物トランスポーターを M4が阻害することにより、臨床的に重要な薬物相互作用が起こるリスクは低いことが示された。

2.6.4.7.3 ISL 及び M4による CYP の誘導

2.6.4.7.3.1 ISL による CYP の誘導

3例のドナーから採取した培養ヒト肝細胞を用いて、CYP1A2、CYP2B6及び CYP3A4に対する ISL の誘導作用を検討した。ISL（最高検討濃度20 µM）を肝細胞と48時間インキュベートし、mRNA 及び酵素活性を測定したところ、in vitro で ISL は CYP1A2、CYP2B6及び CYP3A4に対する明らかな誘導作用を示さなかった。mRNA 及び酵素活性の増加率は CYP1A2、CYP2B6及び CYP3A4に対応する各陽性対照（それぞれオメプラゾール50 µM、フェノバルビタール1000 µM 及びリファンピシン10 µM）の12%以下であったことから、ISL がヒトにおいてこれらの核内受容体経路を誘導する可能性は低い[2.6.5.27.1 項][2.6.5.27.2 項][2.6.5.27.3 項]。

2.6.4.7.3.2 M4による CYP の誘導

3例のドナーから採取した培養ヒト肝細胞を用いて、CYP1A2、CYP2B6及び CYP3A4に対する M4の誘導作用を検討した。M4（最高検討濃度20 µM）を肝細胞と48時間インキュベートし、mRNA 及び酵素活性を測定したところ、in vitro で M4は CYP1A2、CYP2B6及び CYP3A4を誘導しなかった。mRNA 及び酵素活性の増加率は CYP1A2、CYP2B6及び CYP3A4に対応する各陽性対照（それぞれオメプラゾール50 µM、フェノバルビタール1000 µM 及びリファンピシン10 µM）の9%未満であったことから、M4がヒトにおいてこれらの核内受容体経路を誘導する可能性は低い[2.6.5.27.4 項][2.6.5.27.5 項][2.6.5.27.6 項]。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

2.6.4.8.1 ISL 及び M4による BSEP の阻害

ヒト BSEP を含有するバキュロウイルス感染 Sf9細胞から単離した膜小胞を用いて、ISL 及び M4の BSEP に対する阻害作用を検討した[2.6.5.23 項][2.6.5.25 項]。プローブ基質として[^{3}H]タウロコール酸を用い、BSEP を介した輸送の阻害を ISL 又は M4について100 µM までの濃度で評価したところ、ISL は100 µM まで阻害を示さず[2.6.5.23 項]、M4は100 µM で15%阻害した[2.6.5.25 項]。したがって、ISL 及び M4の IC_{50}値はいずれも100 µM 超であり、予定臨床推奨用量を投与した際の ISL 及び M4の曝露量で BSEP が阻害される可能性は低いことが示された。

2.6.4.9 考察及び結論

非臨床動物種での ISL の薬物動態について、血漿クリアランスは中程度又は大きい、分布容積は概して中程度、半減期は0.7～6.3時間であった。マウス、ラット、ウサギ及びサルにおける ISL の経口バイオアベイラビリティは約21%～100%であり、マウス、ウサギ及びサルにおける広範な経口バイオアベイラビリティは初回通過効果の差に起因すると考えられた。放射標識した ISL を用いたこれら動物種での排泄及びマスバランス試験から、PK 試験で観察された経口バイオアベイラビリティよりも ISL の吸収率は顕著に高いことが示された。これはヒトでも同様で、ヒトを対象とした AME 試験で[^{14}C]ISL 10mg を単回経口投与した際の吸収率は約91%であり、ISL の吸収は良好であった。

各動物種における ISL の血漿蛋白質に対する結合率は低く（非結合型分率：0.825～0.968）、血球移行率（血液／血漿中濃度比）は1.1～1.3であった。

ラットに[^{14}C]ISL（3 mg/kg）を単回経口投与した際、[^{14}C]ISL 関連物質は全身に速やかに分布し、大部分の組織で投与1時間後に最高放射能濃度を示した。放射能濃度が最も高かった組織は代謝／排泄系及びリンパ系組織、並びに消化管組織であった。[^{14}C]ISL 関連物質はメラニンに結合することが示され、部分有色 LE ラットのぶどう膜及び皮膚における放射能濃度は無色素の WH ラットよりも高かったが、メラニンへの結合は可逆的であった。WH ラットに[^{14}C]ISL（50 mg/kg/日）を28日間反復経口投与した際も、[^{14}C]ISL は広範な組織に分布した。主要組織における[^{14}C]ISL 関連物質の放射能濃度は14日間にわたり増加し、14日目から28日目までに定常状態に達すると考えられた。その後、初回投与後58日目までに大部分の組織で定量下限未満まで低下した。放射能濃度が最も高かったのは腎臓、肝臓、脾臓、リンパ節及び褐色脂肪組織であった。これらの結果より、[^{14}C]ISL 関連物質は組織中に顕著に滞留しないと考えられる。

ラットに[redacted]ISL をマイクロドーズで静脈内投与した際、リンパ節に[redacted]ISL 関連物質が多く認められ、放射能の大部分は歯、手首、肩及び脊椎領域に認められたが、脳では放射能は検出されなかった。妊娠ラットで ISL は血液－胎盤関門を通過した。出生後ラットを用いた試験において、仔ラットの血漿中に ISL が認められたことから、ISL はラットの乳汁中に排泄されることが示された。

サルに[redacted]ISL をマイクロドーズで静脈内投与した際、[redacted]ISL 関連物質が最も高い濃度で認められたのは膀胱、胆嚢及び脊椎であった。[redacted]ISL 関連物質がリンパ節でも多く認められたが、脳では明らかな放射能濃度は検出されず、これについては ISL の受動的透過性が低く、BCRP の基質であることと一貫していた。

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトに[^{3}H]ISL 又は[^{14}C]ISL を単回経口投与した際、ISL 及び M4が血漿中の主な放射性成分であり、非臨床動物種及びヒトにおいて、ISL は主に未変化体の腎排泄と M4への酸化的脱アミノ反応を介して消失した。血漿中と排泄物中に検出された代謝物は酸化的代謝物並びに直接的及び二次的グルクロ酸抱合体を含んでおり、ヒト血漿中及び排泄物中で同定された全ての代謝物は非臨床動物種においても認められた。

サル及びヒト PBMC における ISL の取込みや ISL から ISL-TP への同化は迅速かつ効率的であり、ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度は血漿中 ISL 濃度よりも顕著に高かった。また、in vitro において、ヒト PBMC における ISL-MP、ISL-DP 及び ISL-TP の細胞内濃度はマウスとサルの PBMC で観察された濃度よりも約10～50倍高く、[^{14}C]ISL を用いたヒト PBMC 中への取込み試験により、PBMC 中への ISL の取込みには能動輸送が関与することが示唆された。

M4はヒト血漿中の主要代謝物であることが確認されたため、追加の薬物動態学的評価を in vitro 試験と非臨床動物種を用いた in vivo 試験で実施した。M4の半減期はいずれの動物種においても1時間以下と短かったことから、ISL を反復投与しても蓄積する可能性は低いと考えられた。M4の血漿蛋白結合率はいずれの動物種においても低く、動物種間で同様であった。血液－血漿分配比は0.6～1.0の範囲で血球への顕著な移行性はみられなかった。ISL をマウス、ラット及びサルに NOAEL で投与した際、血漿中に M4が検出され、これら試験での M4曝露量はヒト曝露量を上回っていた（曝露比：予定臨床推奨用量でのヒトの平均 M4濃度の少なくとも223倍）。よって、主要な非臨床安全性試験において M4の非臨床安全性特性は適切に評価されたと考えられる[2.6.6.8.5 項]。

M4 は ADA を介して生成し、この代謝反応の K_m 値は 250 μM を超えており、ADA は高い代謝能を有する代謝酵素である。K_m 値が高いことを考慮すると、予定臨床推奨用量を投与した際の ISL の濃度で ADA による代謝は飽和しないと考えられる。ADA 阻害剤［例：ペントスタチン（抗白血病薬）］との併用は ISL の血漿中曝露量を増加させる可能性があるが、ISL は主に CYP や UGT 以外の経路で代謝され、未変化体の腎排泄が ISL の主要な消失経路であることから、ISL の薬物動態は CYP や UGT の阻害剤及び誘導剤の影響を受けにくいと考えられる。

ISL から ISL-MP への最初のリン酸化は dCK を介しており、ISL は dCK の低親和性基質である。dCK の基質である 3TC や FTC は ISL の一リン酸化を阻害するため、dCK の高親和性基質を併用投与した際に、dCK を介する ISL のリン酸化を減少させ、相互作用を起こす可能性がある。これは ISL と 3TC を併用した臨床薬物相互作用試験において、ISL-TP の AUC が 87%減少したことと一貫している[2.7.2.2.3.1.3 項]。

ISL は P-gp、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1及び MATE2K の基質ではない。ISL は in vitro で BCRP の基質であったが、ヒト腎皮質での BCRP の発現は低く、腎の BCRP を介した臨床的に意味のある DDI の可能性は低いことが報告されており[4.3: 08RGJ3][4.3: 05LFJQ]、ヒトでの吸収率が高く（約91%）、胆汁中への顕著な排泄がないことを考慮すると、BCRP を介した薬物相互作用を受ける可能性は低いと考えられる。PBMC 中への ISL の取込みには、CNT が部分的に関与していると考えられる。ISL は CNT3の基質であり、CNT1及び CNT2の弱い基質である可能性が示唆されたが、ENT1及び ENT2の基質ではなかった。PBMC への ISL の取込みに複数の経路が関与していること、及び CNT が高い輸送能を有していると考えられることから、PBMC への ISL の取込みにおいて臨床的に意味のある薬物相互作用は生じないと考えられる。

M4は OAT3、MATE2-K 及び BCRP の基質であるが、OAT1、OCT2、MATE1及び P-gp の基質ではないことから、M4の排泄における糸球体ろ過と排出輸送の相対的寄与を考慮すると、M4が薬物

トランスポーターを介した薬物相互作用を受ける可能性は低いと考えられる。

また、ISL 及び M4は、主要な代謝酵素である CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A、UGT1A1及び UGT2B7を阻害せず、CYP1A2、CYP 2B6及び CYP 3A4を誘導しないと考えられる。さらに、臨床的に意味のある濃度において OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OAT1、OAT3、MATE1、MATE2K、BCRP、P-gp 及び BSEP を阻害しない。また、ISL は MRP2、MRP3、MRP4も阻害しない。ICH M12ガイドラインに従って ISL 及び M4の薬物相互作用に関するリスクを評価したところ、ISL 及び M4が薬物相互作用を引き起こすリスクは低いことが示された。

薬物相互作用を検討した臨床試験では、DOR（CYP3A の基質）、アトルバスタチン（OATP1B1 基質）、TDF（テノホビル、OAT1及び OAT3の基質）、メトホルミン（OCT2及び MATE1/2K 基質）、メサドン（CYP1A2、CYP 2D6及び CYP 3A の基質）、エチニルエストラジオール（CYP3A、UGT1A1 及び SULT1E1の基質）、レボノルゲストレル（CYP の基質）及びドルテグラビル（BCRP の基質）の薬物動態への影響は認められなかった[2.7.2.3.3 項]。

以上、in vitro プロファイル並びに DOR 及び ISL の臨床経験に基づくと、DOR と ISL の併用により薬物動態学的薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。DOR は3剤併用レジメンの一部として臨床で使用されており、良好な安全性プロファイルを有している。

配合剤であること、また DOR が感受性の高い CYP3A4の基質であることを考慮すると、DOR/ISL の有効性は CYP3A4誘導剤により低下する可能性がある。

2.6.4.10　参考文献

参考文献は、[1.12 項]の「4.3参考文献」に示した。

目次

略号及び用語の定義
2.6.5 薬物動態試験概要表
2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表
2.6.5.2 非臨床薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験並びに関連分析法の要約表
2.6.5.3 分析法及びバリデーション報告書
2.6.5.4 動物に ISL を単回投与した際の薬物動態
2.6.5.4.1 マウス及びラットにおける ISL の薬物動態
2.6.5.4.2 ウサギ及びサルにおける ISL の薬物動態
2.6.5.5 動物に M4を単回投与した際の薬物動態
2.6.5.6 ラットにおける組織分布
2.6.5.6.1 雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の組織中放射能濃度
2.6.5.6.2 雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）
2.6.5.6.3 雄性 Wistar Han ラットに単回経口投与した際の組織中放射能濃度
2.6.5.6.4 雄性 Wistar Han ラットに単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）
2.6.5.6.5 雄性 Wistar Han ラットに28日間反復経口投与した際の組織中放射能濃度
2.6.5.6.6 雄性 Wistar Han ラットに28日間反復経口投与した際の主要組織中放射能の投与放射能に対する推定割合
2.6.5.6.7 ラットに[redacted]ISL を単回静脈内投与した際の組織分布
2.6.5.7 サル [redacted]ISL を単回静脈内投与した際の組織分布
2.6.5.8 ラットにおける胎盤通過性
2.6.5.9 In vitro における ISL 及び M4の血漿蛋白質との結合
2.6.5.10 血液／血漿分配比
2.6.5.11 In vitro における[^{14}C]ISL のヒト PBMC への取込み
2.6.5.12 In vivo における代謝
2.6.5.12.1 [^{3}H]又は[^{14}C]ISL 経口投与後の動物及びヒトの血漿中・排泄物中における ISL とその代謝物
2.6.5.12.2 ヒト血漿中における ISL 及び M4の半定量（P009試験 5 mg）
2.6.5.12.3 マウス、ラット及びサルの慢性毒性試験における血漿中 M4の半定量
2.6.5.12.4 ラット及びサルに単回経口投与した際の ISL の PBMC 中への取込み及び同化
2.6.5.13 In vitro における代謝
2.6.5.13.1 In vitro における肝細胞での代謝
2.6.5.13.2 In vitro における腸管 S9での代謝
2.6.5.13.3 In vitro における発現系ヒト ADA での代謝
2.6.5.13.4 In vitro におけるラット、サル及びヒト肝細胞での ISL の取込み及び同化

2.6.5.13.5 In vitro におけるマウス新鮮血での PBMC 中への ISL の取込み及び同化
2.6.5.13.6 In vitro におけるサル及びヒト新鮮血での PBMC 中への ISL の取込み及び同化：ISL リン酸化体の凍結融解に対する安定性評価
2.6.5.14 In vitro 及び in vivo における推定代謝経路
2.6.5.15 動物における排泄
2.6.5.15.1 動物に単回静脈内投与した際の ISL の腎排泄
2.6.5.15.2 マウスとウサギに[^{14}C]ISL を単回経口投与した際の総放射能の排泄
2.6.5.15.3 ラットに[^{3}H]ISL を単回経口投与した際の総放射能の排泄
2.6.5.15.4 サルに[^{3}H]ISL を単回経口投与した際の総放射能の排泄
2.6.5.15.5 動物に単回静脈内投与した際の M4の腎排泄
2.6.5.16 ISL の消失に関与する酵素
2.6.5.16.1 ISL の M4への酸化的脱アミノ化に関与する ADA の速度論的パラメータ
2.6.5.17 ISL の同化に関与する酵素
2.6.5.17.1 ISL の ISL-MP への一リン酸化に関与する dCK の速度論的パラメータ
2.6.5.17.2 3TC 及び FTC の一リン酸化に関与する dCK の速度論的パラメータ
2.6.5.17.3 3TC、FTC 及びエンテカビルによる一リン酸化の阻害
2.6.5.18 ISL 及び M4のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価
2.6.5.18.1 LLC-PK1細胞における ISL のヒト P-gp に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.2 Sf9細胞の膜小胞における ISL のヒト P-gp に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.3 MDCKII 細胞における ISL のヒト BCRP に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.4 MDCKII 細胞における ISL のヒト OAT1に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.5 MDCKII 細胞における ISL のヒト OAT3に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.6 CHO-K1細胞における ISL のヒト OCT2に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.7 CHO-K1細胞における ISL のヒト MATE1に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.8 MDCKII 細胞における ISL のヒト MATE2K に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.9 MDCKII 細胞における ISL のヒト CNT1に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.10 MDCKII 細胞における ISL のヒト CTN2に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.11 MDCKII 細胞における ISL のヒト CTN3に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.12 MDCKII 細胞における ISL のヒト ENT1に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.13 MDCKII 細胞における ISL のヒト ENT2に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.14 LLC-PK1細胞における M4のヒト P-gp に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.15 Sf9細胞の膜小胞における M4のヒト P-gp に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.16 MDCKII 細胞における M4のヒト BCRP に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.17 Sf9細胞の膜小胞における M4のヒト BCRP に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.18 MDCKII 細胞における M4のヒト OAT1に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.19 MDCKII 細胞における M4のヒト OAT3に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.20 CHO-K1細胞における M4のヒト OCT2に対する基質認識性の評価
2.6.5.18.21 CHO-K1細胞における M4のヒト MATE1に対する基質認識性の評価

2.6.5.18.22 HEK-293細胞における M4のヒト MATE2K に対する基質認識性の評価
2.6.5.19 ISL 及び M4によるヒト CYP 分子種の阻害
2.6.5.19.1 ISL によるヒト CYP 分子種の可逆的阻害
2.6.5.19.2 M4によるヒト CYP 分子種の可逆的阻害
2.6.5.19.3 ISL によるヒト CYP 分子種の時間依存的阻害
2.6.5.19.4 M4によるヒト CYP 分子種の時間依存的阻害
2.6.5.20 ISL 及び M4によるヒト UGT1A1及び UGT2B7の阻害
2.6.5.20.1 ISL によるヒト UGT1A1及び UGT2B7の阻害
2.6.5.20.2 M4によるヒト UGT1A1及び UGT2B7の阻害
2.6.5.21 ICH M12に基づく ISL による薬物代謝酵素阻害の評価
2.6.5.22 ICH M12に基づく M4による薬物代謝酵素阻害の評価
2.6.5.23 ISL によるヒト薬物トランスポーターの阻害
2.6.5.24 ICH M12に基づく ISL による薬物トランスポーター阻害の評価
2.6.5.25 M4によるヒト薬物トランスポーターの阻害
2.6.5.26 ICH M12に基づく M4による薬物トランスポーター阻害の評価
2.6.5.27 ISL 及び M4によるヒト CYP 分子種の誘導
2.6.5.27.1 ISL によるヒト CYP1A2の誘導
2.6.5.27.2 ISL によるヒト CYP2B6の誘導
2.6.5.27.3 ISL によるヒト CYP3A4の誘導
2.6.5.27.4 M4によるヒト CYP1A2の誘導
2.6.5.27.5 M4によるヒト CYP2B6の誘導
2.6.5.27.6 M4によるヒト CYP3A4の誘導

略号及び用語の定義

略号	定義	
3TC	lamivudine	ラミブジン
ADA	adenosine deaminase	アデノシンデアミナーゼ
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白質
CHO-K1	Chinese hamster ovary-K1	－
CNT1	concentrative nucleoside transporter 1	濃縮型ヌクレオシドトランスポーター1
CNT2	concentrative nucleoside transporter 2	濃縮型ヌクレオシドトランスポーター2
CNT3	concentrative nucleoside transporter 3	濃縮型ヌクレオシドトランスポーター3
CYP	cytochrome P450	チトクロム P450
dCK	deoxycytidine kinase	デオキシシチジンキナーゼ
ENT1	equilibrative nucleoside transporter 1	平衡型ヌクレオシドトランスポーター1
ENT2	equilibrative nucleoside transporter 2	平衡型ヌクレオシドトランスポーター2
FTC	emtricitabine	エムトリシタビン
HEK293	human embryonic kidney 293	－
ICH M12	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Multidisciplinary 12	医薬品規制調和国際会議　複合領域12
ISL	islatravir (MK-8591 or [redacted])	イスラトラビル（MK-8591）
ISL-MP	islatravir monophosphate	イスラトラビル一リン酸体
LLC-PK1	Lilly Laboratories cell-porcine kidney1	－
M4	islatravir metabolite M4, 4′-ethynyl-2-fluoro-2′-deoxyinosine	イスラトラビルの代謝物 M4、4’-エチニル-2-フルオロ-2’-デオキシイノシン
MATE1	multidrug and toxin extrusion protein 1	多剤・毒素排出輸送体1
MATE2K	multidrug and toxin extrusion protein 2K	多剤・毒素排出輸送体2K
MDCKII	Madin-Darby canine kidney II	－
OAT1	organic anion transporter 1	有機アニオントランスポーター1
OAT3	organic anion transporter 3	有機アニオントランスポーター3
OCT2	organic cation transporter 2	有機カチオントランスポーター2
PBMC(s)	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白質
Sf9	spodoptera frugiperda 9	－
UGT	uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase	ウリジン5’-二リン酸グルクロン酸転移酵素

2.6.5　薬物動態試験概要表

ISL に関する非臨床薬物動態試験の概要表を本項に示す。本申請のための DOR に関する新たな非臨床薬物動態試験は実施していないため、DOR の非臨床薬物動態試験の概要表は DOR の製造販売承認申請時の CTD[eCTD 受付番号310828004、2.6.5項]を参照のこと。

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表

Test Article: ISL

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Analytical Methods and Assay Validation				
BP-0254	Mouse	NA	WP	[4.2.2.1.1: 04ZH58]
TM.3200.02	Mouse	NA	[redacted]	[4.2.2.1.2: 06C7VH]
BP-0038	Rat	NA	WP	[4.2.2.1.3: 06G9Z5]
ANI 10944 versions 1-2	Rat	NA	[redacted]	[4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7130]
ANI 11027 versions 1-3	Rat	NA	[redacted]	[4.2.3.7.7.19: TT[redacted]2547]
ANI 11175.01	Rat	NA	[redacted]	[4.2.3.7.6.1: TT[redacted]1000]
ANI 11175.02	Rat	NA	[redacted]	[4.2.3.7.6.1: TT[redacted]1000]
TM.2766.02	Rat	NA	[redacted]	[4.2.3.7.7.19: TT[redacted]2547]
BP-0038A	Rat	NA	WP	[4.2.2.1.3: 06G9Z5]
SBP 447 versions 1-2	Rat	NA	FR	[4.2.2.1.4: 04C8X7] [4.2.2.1.5: 04CD3V] [4.2.2.1.6: 04CD44] [4.2.2.1.7: 04C8X6]
SBP 406 version 1	Rat	NA	FR	[4.2.2.1.8: 04CFHM] [4.2.2.1.9: 04PHMQ] [4.2.2.1.10: 04PHMY] [4.2.2.1.11: 04CFHH]
TM.2733.02	Rat	NA	[redacted]	[4.2.3.7.7.19: TT[redacted]2547]
BP-0174	Rat	NA	WP	[4.2.2.1.12: 0504TX]
BP-0171 version 1	Rat	NA	FR	[4.2.2.1.13: 04FBCP] [4.2.2.1.14: 04QQDV] [4.2.2.1.15: 04V4QZ] [4.2.2.1.16: 04XGPV]
ANI 11087.01	Rabbit	NA	[redacted]	[4.2.2.1.17: 04G24F]

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: ISL

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Analytical Methods and Assay Validation, Continued				
BP-0037	Monkey	NA	WP	[4.2.2.1.18: 06G9YB]
TM.1771.01.1	Monkey	NA	[redacted]	[4.2.2.1.19: 04L2N3]
Absorption after single dose				
Pharmacokinetics; ISL	Mouse / CD-1	IV, PO	WP	[4.2.2.2.1: PK024]
Pharmacokinetics; ISL	Rat / WH	IV, PO	WP	[4.2.2.2.2: PK001]
Pharmacokinetics; ISL	Rabbit / Dutch Belted	IV, PO	WP	[4.2.2.2.1: PK024]
Pharmacokinetics; ISL	Monkey / Rhesus	IV, PO	WP	[4.2.2.2.2: PK001]
Pharmacokinetics; M4	Mouse / CD-1	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Pharmacokinetics; M4	Rat / WH	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Pharmacokinetics; M4	Rabbit / Dutch Belted	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Pharmacokinetics; M4	Monkey / Rhesus	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Distribution				
Single-dose tissue distribution	Rat / WH)	PO	[redacted]	[4.2.2.3.1: PK021]
Single-dose tissue distribution	Rat / Long-Evans	PO	[redacted]	[4.2.2.3.1: PK021]
Multiple-dose tissue distribution	Rat / WH	PO	WP, [redacted]	[4.2.2.3.2: PK006]
PET tissue distribution	Rat / WH	IV	WP	[4.2.2.3.3: PK017]
PET tissue distribution	Monkey / Rhesus	IV	WP	[4.2.2.3.4: PK018]
Placental transfer	Rat / WH	PO	WP	[4.2.2.3.10: TT[redacted]7190]
In vitro reversible plasma protein binding; ISL	Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.3.6: PK009]
In vitro reversible plasma protein binding; M4	Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.7: PK011]

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: ISL

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Distribution, Continued				
Blood-to-plasma partitioning; ISL	Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.3.8: PK010]
Blood-to-plasma partitioning; M4	Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.7: PK011]
Uptake of ISL into PBMCs	Human PBMCs	In vitro	RY	[4.2.2.3.9: PK031]
Metabolism				
Metabolism in vivo (plasma, urine, and feces)	Mouse / CD-1, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.1: PK027]
Metabolism in vivo (plasma)	Rat / WH, Intact	PO	WP, [redacted]	[4.2.2.4.2: PK003]
Metabolism in vivo (bile, urine, and feces)	Rat / WH, BDC	PO	WP, [redacted]	[4.2.2.4.2: PK003]
Metabolism in vivo (plasma, urine, and feces)	Rabbit / Dutch Belted, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.1: PK027]
Metabolism in vivo (plasma, bile, urine, and feces)	Monkey / Rhesus, BDC	PO	WP	[4.2.2.4.2: PK003]
Semi-quantitative analysis of M4 in vivo (plasma)	Mouse / CD-1, rasH2 wild-type, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.3: PK028]
Semi-quantitative analysis of M4 in vivo (plasma)	Rat / WH, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.3: PK028]
Semi-quantitative analysis of M4 in vivo (plasma)	Monkey / Rhesus, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.3: PK028]
Semi-quantitative analysis of M4 in vivo (plasma)	Human	PO	WP	[4.2.2.4.4: PK008]
Uptake and anabolism of ISL in PBMCs in vivo	Rat / WH, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.5: PK005]
Uptake and anabolism of ISL in PBMCs in vivo	Monkey / Rhesus	PO	WP	[4.2.2.4.5: PK005]
Metabolism in hepatocytes	Rat, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.5: PK002]
Metabolism in intestinal S9	Rat, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.5: PK002]
Metabolism via recombinant human adenosine deaminase	Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.5: PK002]
Uptake and anabolism of ISL in hepatocytes	Rat, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.3.5: PK002]
Uptake and anabolism of ISL in PBMCs	Mouse, Monkey, Human	In vitro	WP	[4.2.2.4.5: PK005] [4.2.2.4.6: PK036]

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: ISL

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Excretion				
Excretion (urine), ISL	Mouse / CD-1, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.1: PK024]
Excretion (urine, feces), ISL	Mouse / CD-1, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.1: PK027]
Excretion (urine), ISL	Rat / WH, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.2: PK001]
Excretion (urine, feces, bile), ISL	Rat / WH, BDC	PO	WP, [redacted]	[4.2.2.4.2: PK003]
Excretion (urine), ISL	Rabbit / Dutch Belted, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.1: PK024]
Excretion (urine, feces), ISL	Rabbit / Dutch Belted, Intact	PO	WP	[4.2.2.4.1: PK027]
Excretion (urine), ISL	Monkey / Rhesus, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.2: PK001]
Excretion (urine, feces, bile)	Monkey / Rhesus, BDC	PO	WP	[4.2.2.4.2: PK003]
Excretion (urine), M4	Mouse / CD-1, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Excretion (urine), M4	Rat / WH, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Excretion (urine), M4	Rabbit / Dutch Belted, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Excretion (urine), M4	Monkey / Rhesus, Intact	IV	WP	[4.2.2.2.3: PK025]
Pharmacokinetic Drug Interactions				
Characterization of enzyme kinetics of the adenosine deaminase catalyzed oxidative deamination of ISL to M4	Recombinant Human Adenosine Deaminase	In vitro	WP	[4.2.2.6.1: PK029]
Kinetic characterization of the deoxycytidine kinase catalyzed monophosphorylation of ISL	Recombinant Human Deoxycytidine Kinase	In vitro	WP	[4.2.2.6.2: PK037]
Kinetic characterization of the deoxycytidine kinase catalyzed monophosphorylation of 3TC and FTC	Recombinant Human Deoxycytidine Kinase	In vitro	WP	[4.2.2.6.3: PK0011000773285]
Reversible inhibition of deoxycytidine kinase catalyzed monophosphorylation of ISL by 3TC, FTC, and entecavir	Recombinant Human Deoxycytidine Kinase	In vitro	WP	[4.2.2.6.2: PK037]

C Confidential

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: ISL

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Pharmacokinetic Drug Interactions, Continued				
Evaluation of ISL as a substrate of human MDR1 P-gp	LLC-MDR1 cells, Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.4: PK004] [4.2.2.6.5: PK019]
Evaluation of ISL as a substrate of human BCRP	MDCKII-BCRP cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.5: PK019]
Evaluation of ISL as a substrate of human OAT1 and OAT3	MDCKII-OAT1 cells, MDCKII-OAT3 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.4: PK004]
Evaluation of ISL as a substrate of human OCT-2	CHO-K1-OCT2 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.4: PK004]
Evaluation of ISL as a substrate of human MATE1 and MATE2K	CHO-K1-MATE1 cells, MDCKII-MATE2K cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.5: PK019]
Evaluation of ISL as a substrate of human ENT1 and ENT2	MDCKII-ENT1 cells, MDCKII-ENT2 cells	In vitro	RY	[4.2.2.3.9: PK031]
Evaluation of M4 as a substrate of human MDR1 P-gp	LLC-MDR1 cells, Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.6: PK020]
Evaluation of M4 as a substrate of human BCRP	MDCKII-BCRP cells, Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.6: PK020]
Evaluation of M4 as a substrate of human OAT1 and OAT3	MDCKII-OAT1 cells, MDCKII-OAT3 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.6: PK020]
Evaluation of M4 as a substrate of human OCT-2	CHO-K1-OCT2 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.6: PK020]
Evaluation of M4 as a substrate of human MATE1 and MATE2K	CHO-K1-MATE1 cells, HEK293-MATE2K cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.6: PK020]
Reversible inhibition of human CYP isoforms by ISL	Human liver microsomes	In vitro	WP, [redacted]	[4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.6.7: PK035]
Reversible inhibition of human CYP isoforms by M4	Human liver microsomes	In vitro	[redacted]	[4.2.2.6.8: PK023]
Time dependent inhibition of human CYP isoforms by ISL	Human liver microsomes	In vitro	[redacted], WP	[4.2.2.6.9: PK033] [4.2.2.3.5: PK002]

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: ISL

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Pharmacokinetic Drug Interactions, Continued				
Time dependent inhibition of human CYP isoforms by M4	Human liver microsomes	In vitro	[redacted], RY	[4.2.2.6.10: PK034] [4.2.2.6.11: PK014]
Inhibition of human UGT1A1 by ISL	Human liver microsomes	In vitro	RY	[4.2.2.6.12: PK007]
Inhibition of human UGT2B7 by ISL	Human liver microsomes	In vitro	[redacted]	[4.2.2.6.13: PK038]
Inhibition of human UGT1A1 by M4	Human liver microsomes	In vitro	RY	[4.2.2.6.14: PK013]
Inhibition of human UGT2B7 by M4	Human liver microsomes	In vitro	BT	[4.2.2.6.15: PK039]
Inhibition of human OATP1B1- and OATP1B3-mediated transport by ISL	HEK293-OATP1B1 cells, HEK293-OATP1B3 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.16: PK032]
Inhibition of human OCT1- and OCT2-mediated transport by ISL	CHO-K1-OCT1 cells, CHO-K1-OCT2 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.4: PK004] [4.2.2.6.16: PK032]
Inhibition of human OAT1- and OAT3-mediated transport by ISL	MDCKII-OAT1 cells, MDCKII-OAT3 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.4: PK004]
Inhibition of human MATE1- and MATE2K-mediated transport by ISL	CHO-K1-MATE1 cells, MDCKII-MATE2K cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.17: PK015]
Inhibition of human P-gp-mediated transport by ISL	LLC-PK1 cells	In vitro	[redacted]	[4.2.2.6.18: PK012]
Inhibition of human BCRP-mediated transport by ISL	Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.17: PK015]
Inhibition of human BSEP-mediated transport by ISL	Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.4: PK004]
Inhibition of human MRP2, MRP3, and MRP4 mediated transport by ISL	Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.4: PK004]
Inhibition of human OATP1B1- and OATP1B3-mediated transport by M4	HEK293-OATP1B1 cells, HEK293-OATP1B3 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.19: PK016]
Inhibition of human OCT1- and OCT2-mediated transport by M4	CHO-K1-OCT1 cells, CHO-K1-OCT2 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.19: PK016]

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Test Article: ISL

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Pharmacokinetic Drug Interactions, Continued				
Inhibition of human OAT1- and OAT3-mediated transport by M4	MDCKII-OAT1 cells, MDCKII-OAT3 cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.19: PK016]
Inhibition of human MATE1- and MATE2K-mediated transport by M4	CHO-K1-MATE1 cells, MDCKII-MATE2K cells	In vitro	RY	[4.2.2.6.19: PK016]
Inhibition of human P-gp-mediated transport by M4	LLC-MDR1 cells	In vitro	[redacted]	[4.2.2.6.20: PK026]
Inhibition of human BCRP-mediated transport by M4	Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.19: PK016]
Inhibition of human BSEP-mediated transport by M4	Sf9 membrane vesicles	In vitro	RY	[4.2.2.6.19: PK016]
Induction of human CYP1A2, 2B6, and 3A4 by ISL	Human hepatocytes	In vitro	[redacted]	[4.2.2.3.5: PK002]
Induction of human CYP1A2, 2B6, and 3A4 by M4	Human hepatocytes	In vitro	[redacted]	[4.2.2.6.21: PK022]

3TC=lamivudine; BCRP=breast cancer resistance protein; BDC=bile duct-cannulated; BSEP=bile salt export pump; CHO-K1=Chinese hamster ovary-K1; CNT1=concentrative nucleoside transporter 1; CNT2=concentrative nucleoside transporter 2; CNT3=concentrative nucleoside transporter 3; CYP=cytochrome P450; CYP1A2=cytochrome P450 1A2; CYP2B6=cytochrome P450 2B6; CYP3A4=cytochrome P450 3A4; ENT1=equilibrative nucleoside transporter 1; ENT2=equilibrative nucleoside transporter 2; FTC=emtricitabine; HEK293=human embryonic kidney 293; ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LLC-MDR1=Lilly Laboratories cell-porcine kidney1 cells stably expressing human multidrug resistance protein 1 P-glycoprotein; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MRP2=Multidrug resistance-associated protein 2; MRP3=multidrug resistance-associated protein 3; MRP4=multidrug resistance-associated protein 4; NA=not applicable; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; PET=positron emission tomography; P-gp=P-glycoprotein; PO=oral(ly); Sf9=spodoptera frugiperda 9; USA=United States of America; UGT1A1=uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1; WH=Wistar Han.

Testing Facilities: [redacted], USA; **BT**=Merck Research Laboratories Boston (BT), Boston, Massachusetts, USA; [redacted] USA; [redacted] USA; **FR**=Laboratoires Merck Sharp & Dohme-Chibret Merck Research Laboratoires Route de Marsat, Riom, France; [redacted] Canada; [redacted] USA; [redacted] China; [redacted] USA; Q [redacted] USA; **RY**=Merck Research Laboratories Rahway (RY), Rahway, New Jersey, USA; [redacted] Canada; **WP**=Merck Research Laboratories West Point (WP), West Point, Pennsylvania, USA; [redacted] USA; [redacted] China.

Confidential

2.6.5.2　非臨床薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験並びに関連分析法の要約表

Test Articles: ISL, ISL Metabolite M4, ISL-MP, ISL-DP, ISL-TP, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

Species / Strain	Study Number	Analyte(s)	Type of Analytical Method	Matrix	Bioanalytical Method Reference	Regulatory Study Status
Mouse / CD-1 and rasH2 wild type	TT #[redacted]-0005 [4.2.3.7.7.2: TT[redacted]0005]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non GLP
Mouse / CD-1	TT #[redacted]-1020 [4.2.3.2.2: TT[redacted]1020]	ISL M4	LC-MS/MS LC-HRMS	Plasma	BP-0254 Exploratory Assay	GLP Non GLP
Mouse / rasH2 wild type	TT #[redacted]-6002 [4.2.3.2.1: TT[redacted]6002]	ISL M4	LC-MS/MS LC-HRMS	Plasma	BP-0254 Exploratory Assay	GLP Non GLP
Mouse / CByB6F1/Tg rasH2 Hemizygous	TT #[redacted]-9007 [4.2.3.4.2.1: TT[redacted]9007]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	TM.3200.02	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1040 [4.2.3.2.3: TT[redacted]1040]	ISL ISL-TP	LC-MS/MS	Plasma, PBMC, Heart Liver, Kidney, Skeletal Muscle	Exploratory Assay	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1075 [4.2.3.2.5: TT[redacted]1075]	ISL ISL-MP ISL-DP ISL-TP	LC-MS/MS	Plasma PBMC	BP-0038 Exploratory Assay	GLP (Plasma) Non GLP (PBMC)
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-2508 [4.2.3.7.7.5: TT[redacted]2508]	ISL ISL-MP ISL-DP ISL-TP	LC-MS/MS	Plasma PBMC	Exploratory Assay	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-2513 [4.2.3.2.4: TT[redacted]2513]	ISL ISL-MP ISL-DP ISL-TP	LC-MS/MS	Plasma PBMC	Exploratory Assay	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-6011 [4.2.3.2.6: TT[redacted]6011]	ISL M4	LC-MS/MS LC-HRMS	Plasma	BP-0038 Exploratory Assay	GLP Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-7001 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7001]	ISL	LC-MS/MS	Plasma (Maternal)	BP-0038 Maternal Equivalence	Non GLP

C Confidential

2.6.5.2　非臨床薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験並びに関連分析法の要約表（続き）

Test Articles: ISL, ISL Metabolite M4, ISL-MP, ISL-DP, ISL-TP, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

Species / Strain	Study Number	Analyte(s)	Type of Analytical Method	Matrix	Bioanalytical Method Reference	Regulatory Study Status
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1022 [4.2.3.7.7.21: TT[redacted]1022]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT#[redacted]-1067 [4.2.3.7.7.6: TT[redacted]1067]	ISL ISL-MP ISL-DP ISL-TP	LC-MS/MS	Plasma PBMC	Exploratory Assay Exploratory Assay	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1068 [4.2.3.7.7.22: TT[redacted]1068]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1221 [4.2.3.7.7.12: TT[redacted]1221]	ISL [redacted]	LC-MS/MS	Plasma	BP-0038 (ISL) Exploratory Assay ([redacted]	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1225 [4.2.3.7.7.15: TT[redacted]1225]	ISL [redacted]	LC-MS/MS	Plasma	ANI 11027.01 (ISL) SBP 447 ([redacted]	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-6005 [4.2.3.2.7: TT[redacted]6005]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	ANI 10944.01	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-7035 [4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7035]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-7190 [4.2.2.3.10: TT[redacted]7190]	ISL	LC-MS/MS	Plasma (Maternal/Fetal)	BP-0038 v2	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-7080 [4.2.3.5.2.2: TT[redacted]7080]	ISL	LC-MS/MS	Plasma (Maternal)	ANI 10944.01 Maternal equivalence	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-7130 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7130]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	ANI 10944.02	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1012 [4.2.3.2.8: TT[redacted]1012]	ISL Doravirine	LC-MS/MS	Plasma	SBP-406 v.16 (Doravirine) ANI 11027.03 (ISL)	GLP

C Confidential

2.6.5.2 非臨床薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験並びに関連分析法の要約表（続き）

Test Articles: ISL, ISL Metabolite M4, ISL-MP, ISL-DP, ISL-TP, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

Species/Strain	Study Number	Analyte(s)	Type of Analytical Method	Matrix	Bioanalytical Method Reference	Regulatory Study Status
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1052 [4.2.3.7.7.13: TT[redacted]1052]	ISL [redacted]	LC-MS/MS	Plasma	BP-0038 (ISL) BP-0174 ([redacted] and Tenofovir) BP-0171 ([redacted]	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-6049 [4.2.3.7.7.14: TT[redacted]6049]	ISL [redacted] Tenofovir	LC-MS/MS	Plasma	BP-0038 (ISL BP-0171 ([redacted] BP-0174 ([redacted] and Tenofovir)	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1043 [4.2.3.4.1.1: TT[redacted]1043]	ISL M4	LC-MS/MS	Plasma	BP-0038A (ISL) BP-0295 (M4)	GLP Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1000 [4.2.3.7.6.1: TT[redacted]1000]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	ANI 11175.01	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-2547 [4.2.3.7.7.19: TT[redacted]2547]	ISL Etonogestrel	LC-MS/MS	Plasma	TM.2766.02 0.500 to 200 ng/mL TM.2733.02	Non GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-1013 [4.2.3.7.6.2: TT[redacted]1013]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	ANI 11175.02	GLP
Rat / Wistar Han	TT #[redacted]-7100 [4.2.3.7.7.7: TT[redacted]7100]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	ANI 11175.02	GLP
Rabbit / Dutch Belted	TT #[redacted]-7023 [4.2.3.7.7.8: TT[redacted]7023]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non GLP
Rabbit / Dutch Belted	TT #[redacted]-7064 [4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7064]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non GLP
Rabbit / Dutch Belted	TT #[redacted]-7040 [4.2.3.5.2.4: TT[redacted]7040]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	SOP ANI 11087.01	GLP

C Confidential

2.6.5.2　非臨床薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験並びに関連分析法の要約表（続き）

Test Articles: ISL, ISL Metabolite M4, ISL-MP, ISL-DP, ISL-TP, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

Species/Strain	Study Number	Analyte(s)	Type of Analytical Method	Matrix	Bioanalytical Method Reference	Regulatory Study Status
Monkey / Rhesus	TT #[redacted]-1035 [4.2.3.2.9: TT[redacted]1035]	ISL ISL-MP ISL-DP ISL-TP	LC-MS/MS	Plasma PBMC	Exploratory Assay Exploratory Assay	Non GLP Non GLP
Monkey / Rhesus	TT #[redacted]-1045 [4.2.3.7.7.9: TT[redacted]1045]	ISL	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non GLP
Monkey / Rhesus	TT #[redacted]-1063 [4.2.3.2.10: TT[redacted]1063]	ISL ISL-MP ISL-DP ISL-TP	LC-MS/MS	Plasma PBMC	BP-0037 PBMC Exploratory Assay	GLP (Plasma) Non GLP (PBMC)
Monkey / Rhesus	TT #[redacted]-1068 [4.2.3.2.11: TT[redacted]1068]	ISL ISL-MP ISL-DP ISL-TP M4	LC-MS/MS LC-HRMS	Plasma PBMC	BP-0037 PBMC Exploratory Assay Exploratory Assay (M4)	GLP (Plasma, ISL) Non GLP (PBMC) Non GLP (Plasma, M4)

BP=bioanalytical procedure; DP=diphosphate; GLP=Good Laboratory Practice; ISL=islatravir; LC-HRMS=liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MP=monophosphate; NA=not applicable; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; TM=test method; TP=triphosphate; [redacted] v=version.

C Confidential

2.6.5.3 分析法及びバリデーション報告書

Test Articles: ISL, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

Validation Report Number	VR BP-0254[a]	[redacted] 217005AZHF[b]	VR BP-0038 GLP Rat[c]	[redacted] 157032AMHA[d]	[redacted] 157076ANJZ[e]	[redacted] 167125APJQ[f]	[redacted] 167125APJQ[fg]	[redacted] 157076ANJZ[e]	VR BP-0038A[h]
Bioanalytical Method Number	BP-0254	TM.3200.02	BP-0038	ANI 10944.01 ANI 10944.02;	ANI 11027.01 ANI 11027.02 ANI 11027.03	ANI 11175.01	ANI 11175.02	TM.2766.02	BP-0038A
Activity	Validation Mouse plasma	Validation Mouse plasma	Validation Rat plasma[i]	Validation Rat plasma	Validation Rat plasma	Validation Rat plasma	Validation Rat plasma	Partial Validation Rat plasma	Partial Validation Rat plasma
Species	Mouse	Mouse	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat
Analyte	ISL	ISL	ISL	ISL	ISL	ISL	ISL	ISL	ISL
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	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	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 Quantification (LLQ to ULQ) (ng/mL)	2 to 2000	2 to 2000	2 to 2000	2 to 2000	0.5 to 2000	0.100 to 200	0.100 to 200	0.500 to 200	2 to 2,000
QC Nominal Concentration (ng/mL)	2, 6, 200, 1500	2, 6, 1000, 1500	2, 6, 200, 1500	2, 6, 1000, 1500	0.5, 1.5, 1000, 1500	0.1, 0.3, 100, 150	0.3, 0.1, 100, 150	0.5, 1.5, 100, 150	2, 6, 200, 1500
QC Inter-day Accuracy Range (% Bias)	- 2.0 to 1.5	- 1.3 to 1.8	- 0.5 to 1.5	0.6 to 4.4	- 2.6 to 0.3	- 2.3 to 3.7	- 2.3 to 3.7	- 4.8 to 9.0	- 0.5 to1.5
QC Inter-day Precision Range (% CV)	3.1 to 8.2	2.2 to 6.7	1.6 to 6.4	3.0 to 6.3	2.2 to 7.9	1.8 to 17.1	1.8 to 17.1	1.9 to 6.2	1.6 to 5.6
Matrix LTS	34 days - 70°C	26 days - 20°C and - 80°C	83 days - 70°C	110 days - 20°C and - 80°C	529 days - 20°C and - 80°C	190 days - 20°C and - 80°C	190 days - 20°C and - 80°C	NA	83 days - 70°C
Dilution Integrity QC (Dilution Factor) (ng/mL)	40,000 (50)	10,000 (20)	25,000 (20)	10,000 (20)	10,000 (20)	1000 (20)	1000 (20)	NA	NA

2.6.5.3 分析法及びバリデーション報告書（続き）

Test Article: ISL, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

Validation Report Number	VR 447 GLP Rat Version 1 [4.2.2.1.4: 04C8X7]	VR-406 GLP Rat, Version 1 [4.2.2.1.8: 04CFHM]	[redacted] 197240AWPX[i]	VR BP-0174 v3.0 [4.2.2.1.12: 0504TX]		VR BP-0171 GLP Rat Plasma [4.2.2.1.13: 04FBCP]
Bioanalytical Method Number	SBP 447 v1 to v2	SBP 406 v1	TM.2733.02	BP-0174		BP-0171 v1
Activity	Validation Rat plasma[j,k]	Validation Rat plasma[l,m]	Validation Rat plasma	Validation Rat plasma[g]		Validation Rat plasma[n]
Species	Rat	Rat	Rat	Rat		Rat
Analyte	[redacted]	Doravirine	Etonogestrel	[redacted]	Tenofovir	[redacted]
Matrix	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
Regression Model	Quadratic $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$
Range of Quantification (LLQ to ULQ) (ng/mL)	4.99 to 4990	12.4 to 4850	1 to 100	2.63 to 2630	5.25 to 5250	10 to 10,000
QC Nominal Concentration (ng/mL)	4.99, 12.5, 312, 3900	29.5, 1480, 3690 29.3, 1470, 3660	1, 3, 50, 75	2.63, 7.14, 328, 2000	5.25, 14.3, 656, 3990	10.2, 25.6, 639, 8000
QC Inter-day Accuracy Range (% Bias)	0.0 to 1.8	-4.4 to 2.2[o] -1.6 to 0.3[o]	-7.6 to 1.5	-0.4 to 3.0	-5.3 to -2.6	-3.0 to 5.0
QC Inter-day Precision Range (% CV)	2.5 to 4.2	1.2 to 4.2[o] 2.7 to 5.2[o]	2.8 to 9.8	1.8 to 6.4	2.1 to 13.7	2.0 to 4.0
Matrix LTS	54 days[p] - 70°C	1200 Days[q] - 70°C	99 days - 20°C and - 80°C	590 days - 70°C	590 days - 70°C	396 days[r] - 70°C
Dilution Integrity QC (Dilution Factor) (ng/mL)	26,800 (1/200)	47,200 (1/200)	1000 (20)	26,300 (20)	52,500 (20)	51,200 (200) 218,000[s] (100)

C Confidential

2.6.5.3　分析法及びバリデーション報告書（続き）

Test Article: ISL, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

Validation Report Number	[redacted] 167022AOIG [4.2.2.1.17: 04G24F]	VR BP-0037 GLP Monkey [4.2.2.1.18: 06G9YB]	[redacted] 10952.101416 [4.2.2.1.19: 04L2N3]
Bioanalytical Method Number	ANI 11087.01	BP-0037	TM.1771.01.1
Activity	Validation Rabbit plasma[g]	Validation Monkey plasma	Validation Monkey Plasma
Species	Rabbit	Monkey	Monkey
Analyte	ISL	ISL	ISL
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma
Method	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Regression Model	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$
Range of Quantification (LLQ to ULQ) (ng/mL)	1 to 5000	2 to 2000	0.100 to 400
QC Nominal Concentration (ng/mL)	1, 3, 2500, 3750	2, 6, 200, 1500	0.1, 0.3, 50, 300
QC Inter-day Accuracy Range (% Bias)	- 0.0 to 8.9	- 1.8 to 4.0	- 4.7 to 0.3
QC Inter-day Precision Range (% CV)	3.2 to 10.8	2.1 to 6.6	2.5 to 15.0
Matrix LTS	10 days - 20°C and 60 days - 70°C	25 days - 70°C	16 days - 20°C and - 80°C
Dilution Integrity QC (Dilution Factor) (ng/mL)	10,000 (20)	25,000 (20)	500 (10)

C Confidential

2.6.5.3　分析法及びバリデーション報告書（続き）

Test Article: ISL, Doravirine, Etonogestrel, Tenofovir, [redacted]

CV=coefficient of variation; GLP=Good Laboratory Practice; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLQ=lower limit of quantification; LTS=long-term stability; NA=not applicable; QC=quality control; [redacted] ULQ=upper limit of quantification; v=version.

[a] WR BP-0254 [4.2.2.1.1: 04ZH58].

[b] 217005AZHF [4.2.2.1.2: 06C7VH].

[c] VR BP-0038-GLP Rat [4.2.2.1.3: 06G9Z5].

[d] 157032AMHA Revision 03 - 16-7130 Bioanalytical Report [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7130].

[e] 157076ANJZ Revision 04 - 19-2547 Bioanalytical Report [4.2.3.7.7.19: TT[redacted]2547].

[f] 167125APJQ Revision 01 - TT#[redacted]-1000 Final Study Report [4.2.3.7.6.1: TT[redacted]1000].

[g] Maternal equivalence performed.

[h] VR BP-0038A [4.2.2.1.3: 06G9Z5].

[i] 197240AWPX - 19-2547 Bioanalytical Report [4.2.3.7.7.19: TT[redacted]2547].

[j] VR 447 GLP Rat Addendum 3 Version 1 (Validation of Robotic method transfer)) [4.2.2.1.5: 04CD3V].

[k] VR 447 GLP Rat Addendum 4 Version 1 ([redacted] ISL interference evaluation) [4.2.2.1.6: 04CD44].

[l] VR 406 GLP Rat Plasma Addendum 4 Version 1 (Doravirine, ISL interference evaluation) [4.2.2.1.9: 04PHMQ].

[m] VR 406 GLP Rat Plasma Addendum 5 Version 1 (Validation of Robotic method transfer) [4.2.2.1.10: 04PHMY].

[n] VR BP-0171 GLP Rat Plasma Addendum 4 ([redacted] ISL, [redacted] and Tenofovir interference evaluation) [4.2.2.1.15: 04V4QZ].

[o] Intra-day accuracy and precision range reported.

[p] VR 447 GLP Rat Addendum 2 Version 2 (Matrix LTS) [4.2.2.1.7: 04C8X6].

[q] VR 406 GLP Rat Addendum 3 Version 1 (Matrix LTS) [4.2.2.1.11: 04CFHH].

[r] VR BP-0171 GLP Rat Plasma Addendum 3 (Matrix LTS) [4.2.2.1.14: 04QQDV].

[s] VR BP-0171 GLP Rat Plasma Addendum 5 (Dilution Integrity) [4.2.2.1.16: 04XGPV].

C Confidential

2.6.5.4　動物に ISL を単回投与した際の薬物動態

2.6.5.4.1　マウス及びラットにおける ISL の薬物動態

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.2.1: PK024]	[4.2.2.2.1: PK024]	[4.2.2.2.2: PK001]	[4.2.2.2.2: PK001]
Species / Strain	Mouse / CD-1	Mouse / CD-1	Rat / Wistar Han	Rat / Wistar Han
Gender / Number of Animals	M / 15	M / 12 (3 per time point)	M / 3	M / 3
Feeding Condition	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle / Formulation	30% captisol / solution	10% Tween 80/ solution	30% captisol / solution	10% Tween 80 / solution
Method of Administration	IV	PO	IV	PO
Dose (mg/kg)	1	2	1	5
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	ISL	ISL	ISL	ISL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters[a,b]:				
CL_p (mL/min/kg)	25.2	NA	72 ± 4	NA
CL_r (mL/min/kg)[c]	15.4[d]	NA	11.5[e]	NA
Vd_{ss} (L/kg)	2.0	NA	3.1 ± 0.2	NA
$t_{½}$ (h)	2.1	NA	0.7 ± 0.1	NA
$AUC_{0\text{-}inf}$ (h*µM)	2.2	2.4	0.8 ± 0.0	5.0 ± 0.7
C_{max} (µM)	NA	1.2	NA	3.0 ± 0.6
T_{max} (h)	NA	0.3	NA	0.6 ± 0.4
Bioavailability (%)[f]	NA	21	NA	127 ± 2

C Confidential

2.6.5.4　動物に ISL を単回投与した際の薬物動態（続き）
2.6.5.4.1　マウス及びラットにおける ISL の薬物動態（続き）

Test Article: ISL

$AUC_{0\text{-}inf}$=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; CL_p=plasma clearance; CL_r=renal clearance; C_{max}=observed maximum concentration; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; M=male; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic(s); PO=oral(ly); $t_{1/2}$=half-life; T_{max}=time to reach maximum concentration; Vd_{ss}=volume of distribution at steady-state.

[a] Mice: Values for mice are shown as mean values. Plasma was obtained by sequential orbital and terminal bleeding for mice, so that 2 sampling times were taken from each animal.

[b] Rat: Values for rat are shown as mean ± standard deviation. Plasma was obtained by serial bleeding of n=3 for rats.

[c] Assessment of renal clearance of ISL summarized in [Sec. 2.6.5.15].

[d] Represents mean values from sparse sampling (n=3) and calculated using the mean body weight for mouse.

[e] Represents the mean values from sparse sampling (n=6) and calculated using the average rat body weight of 0.288 kg.

[f] Bioavailability was calculated using the dose normalized mean $AUC_{0\text{-}inf}$ value for PO for mice or the dose normalized individual $AUC_{0\text{-}inf}$ value for PO in rats relative to the mean $AUC_{0\text{-}inf}$ for IV administration.

C Confidential

2.6.5.4　動物に ISL を単回投与した際の薬物動態（続き）

2.6.5.4.2　ウサギ及びサルにおける ISL の薬物動態

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.2.1: PK024]	[4.2.2.2.1: PK024]	[4.2.2.2.2: PK001]	[4.2.2.2.2: PK001]
Species / Strain	Rabbit / Dutch Belted	Rabbit / Dutch Belted	Monkey / Rhesus	Monkey / Rhesus
Gender / Number of Animals	F / 3	F / 3	M / 3	F / 1 and M / 2
Feeding Condition	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle / Formulation	30% captisol / solution	10% Tween 80 / solution	30% captisol / solution	10% Tween 80 / solution
Method of Administration	IV	PO	IV	PO
Dose (mg/kg)	1	2	1	5
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	ISL	ISL	ISL	ISL
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters[a]:				
CL_p (mL/min/kg)	17.2 ± 4.9	NA	17.1 ± 3.3	NA
CL_r (mL/min/kg)[b]	5.3 ± 1.7[c]	NA	8.7 ± 2.2[d]	NA
Vd_{ss} (L/kg)	1.5 ± 0.4	NA	4.3 ± 1.3	NA
$t_{½}$ (h)	2.3 ± 1.0	NA	6.3 ± 0.7	NA
$AUC_{0\text{-}inf}$ (h*μM)	3.5 ± 0.8	3.1 ± 1.2	3.4 ± 0.7	6.5 ± 3.0
C_{max} (μM)	NA	1.4 ± 0.9	NA	1.5 ± 0.7
T_{max} (h)	NA	0.8 ± 0.3	NA	1.7 ± 0.6
Bioavailability (%)[e]	NA	45 ± 15	NA	38 ± 18

C Confidential

2.6.5.4　動物に ISL を単回投与した際の薬物動態（続き）
2.6.5.4.2　ウサギ及びサルにおける ISL の薬物動態（続き）

Test Article: ISL

$AUC_{0\text{-}inf}$=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; CL_p=plasma clearance; CL_r=renal clearance; C_{max}=observed maximum concentration; F=female; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; M=male; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic(s); PO=oral(ly); $t_{1/2}$=half-life; T_{max}=time to reach maximum concentration; Vd_{ss}=volume of distribution at steady-state.

[a] Values are shown as mean ± standard deviation (n=3).

[b] Assessment of renal clearance of ISL summarized in [Sec. 2.6.5.15].

[c] Calculated using the individual body weight of each rabbit.

[d] Calculated using the average body weight of 8.1 kg.

[e] Bioavailability in rabbits and monkeys was calculated using the dose normalized individual $AUC_{0\text{-}inf}$ values for PO relative to the mean $AUC_{0\text{-}inf}$ for IV administration.

C Confidential

2.6.5.5　動物に M4を単回投与した際の薬物動態

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.2.3: PK025]	[4.2.2.2.3: PK025]	[4.2.2.2.3: PK025]	[4.2.2.2.3: PK025]
Species / Strain	Mouse / CD-1	Rat / Wistar Han	Rabbit / Dutch Belted	Monkey / Rhesus
Gender / Number of Animals	M / 15	M / 3	F / 3	M / 3
Feeding Condition	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle / Formulation	30% captisol / solution	30% captisol / solution	30% captisol / solution	30% captisol / solution
Method of Administration	IV	IV	IV	IV
Dose (mg/kg)	1	1	1	1
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	M4	M4	M4	M4
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters[a,b]:				
CL_p (mL/min/kg)	38.7	27.7 ± 1.3	33.5 ± 8.4	12.0 ± 4.8
CL_r (mL/min/kg)[c]	20.4	21.3 ± 3.1	21.1 ± 9.1	6.5 ± 1.9
Vd_{ss} (L/kg)	0.28	0.88 ± 0.06	0.56 ± 0.11	0.49 ± 0.18
$t_{½}$ (h)	0.36	0.45 ± 0.01	0.25 ± 0.09	1.0 ± 0.5
$AUC_{0\text{-}inf}$ (h*µM)	1.5	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.5	5.4 ± 2.6

$AUC_{0\text{-}inf}$=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; CL_p=plasma clearance; CL_r=renal clearance; F=female; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; M=male; min=minute(s); n=number; PK=pharmacokinetic(s); $t_{1/2}$=half-life; Vd_{ss}=volume of distribution at steady-state.

[a] Mice: Values are shown as mean values. Plasma was obtained by sequential orbital and terminal bleeding for mice, such that 2 sampling times were taken from each animal.

[b] Rat, Rabbit, Monkey: Values are shown as mean ± standard deviation with plasma obtained by serial bleeding (n=3).

[c] Assessment of renal clearance of ISL metabolite M4 summarized in [Sec. 2.6.5.15].

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布

2.6.5.6.1　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の組織中放射能濃度

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.3.1: PK021]					
Species / Strain		Rat / Long-Evans					
Gender / Number of Animals		M / 6 (1 per time point)					
Feeding Condition		Fasted					
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 in water / solution					
Method of Administration		PO					
Dose (mg/kg) / (µCi/kg)		3 / 85.8					
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)		[^{14}C]ISL / 165.66					
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		28.65					
Analyte		Radioactivity					
Method of Analysis		QWBA, LSC					
Sampling Times		1, 6, 10, 24, 72, and 168 h (postdose)					
Tissue Type	**Tissue**	**Concentration (nmol equiv/g)[a,b]**					
		1 h	**6 h**	**10 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Vascular / Lymphatic	Plasma (LSC)	2.794	0.153	0.081	0.042	BLQ	BLQ
	Blood (LSC)	2.062	0.157	0.097	0.054	BLQ	BLQ
	Aorta	4.800	0.343	0.221	0.123	BLQ	BLQ
	Blood (cardiac)	2.511	0.128	0.097	BLQ	BLQ	BLQ
	Bone Marrow (femur)	3.877	0.361	0.258	0.151	BLQ	BLQ
	Lymph Node (axillary)	NS	NS	0.465	NS	NS	NS
	Lymph Node (brachial)	33.892	NS	1.724	0.583	0.129	BLQ

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.1　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Concentration (nmol equiv/g)[a,b]					
		1 h	6 h	10 h	24 h	72 h	168 h
Vascular / Lymphatic, Continued	Lymph Node (cervical)	28.015	3.191	0.805	0.614	0.192	BLQ
	Lymph Node (inguinal)	13.591	1.973	1.161	0.493	0.210	BLQ
	Lymph Node (parathymic)	16.702	NS	1.392	0.410	0.149	BLQ
	Lymph Node (popliteal)	NS	NS	0.954	0.253	NS	NS
	Lymph Node (sciatic)	6.168	2.133	0.969	0.329	0.187	NS
	Lymph Node (submandibular)	24.923	1.915	0.957	0.876	0.097	BLQ
	Spleen	13.886	1.347	0.849	0.464	0.166	BLQ
	Thymus	13.114	0.921	0.536	0.261	0.115	BLQ
Excretory / Metabolic	Kidney	16.486	0.859	0.479	0.285	0.106	BLQ
	Kidney (cortex)	16.927	0.927	0.548	0.310	0.109	BLQ
	Kidney (medulla)	14.546	0.662	0.358	0.230	0.099	BLQ
	Liver	19.717	2.205	1.078	0.429	0.202	BLQ
	Urinary Bladder Wall	199.356	25.229	0.456	0.219	0.173	BLQ
	Urinary Bladder contents	660.912	69.044	4.490	0.970	0.076	BLQ
Central Nervous System	Brain (whole)	0.413	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Brain (cerebellum)	0.448	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Brain (cerebrum)	0.566	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Brain (medulla)	0.156	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Spinal Cord	0.453	0.111	0.067	BLQ	BLQ	BLQ

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.1　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Concentration (nmol equiv/g)[a,b]					
		1 h	6 h	10 h	24 h	72 h	168 h
Endocrine	Adrenal Gland	3.805	0.327	0.126	0.144	0.086	BLQ
	Adrenal Cortex	3.846	0.321	0.125	0.152	0.083	BLQ
	Adrenal Medulla	3.630	0.379	0.136	0.159	0.087	BLQ
	Pituitary Gland	2.079	0.137	0.133	BLQ	BLQ	BLQ
	Thyroid Gland	5.132	0.282	0.158	0.073	BLQ	BLQ
Secretory	Exorbital Lacrimal Gland	2.618	0.378	0.168	0.071	BLQ	BLQ
	Harderian Gland	2.428	0.429	0.347	0.168	BLQ	BLQ
	Intraorbital Lacrimal Gland	2.284	0.285	0.110	0.067	BLQ	BLQ
	Pancreas	3.903	0.659	0.270	0.131	BLQ	BLQ
	Salivary Gland	2.602	0.336	0.085	BLQ	BLQ	BLQ
Fatty	Abdominal Fat	1.511	0.162	0.123	0.094	BLQ	BLQ
	Brown Fat	4.472	0.469	0.173	0.251	0.071	BLQ
Dermal	Skin (non-pigmented)	3.160	0.509	0.185	0.166	0.103	BLQ
	Skin (pigmented)	5.711	1.279	0.888	0.195	0.110	BLQ
Reproductive	Epididymis	2.490	0.272	0.181	0.105	0.065	BLQ
	Prostate Gland	2.487	0.358	0.265	0.161	BLQ	BLQ
	Seminal Vesicles	2.404	0.354	0.215	0.083	BLQ	BLQ
	Testis	1.891	0.276	0.197	0.118	0.069	BLQ

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.1　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Concentration (nmol equiv/g)[a,b]					
		1 h	6 h	10 h	24 h	72 h	168 h
Skeletal / Muscular	Bone (femur)	1.151	0.186	0.088	0.076	BLQ	BLQ
	Diaphragm	3.858	0.257	0.186	0.165	0.103	BLQ
	Heart	4.212	0.305	0.199	0.082	0.068	BLQ
	Muscle (femoral)	3.036	0.162	0.167	0.118	0.088	BLQ
Respiratory	Lung	3.784	0.390	0.312	0.155	0.068	BLQ
	Nasal Turbinates	0.849	0.164	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Trachea	3.143	0.209	0.148	BLQ	BLQ	BLQ
Gastrointestinal Tract / Contents	Cecum Mucosa	6.843	3.702	0.648	0.447	0.101	BLQ
	Cecum (contents)	3.154	16.951	0.307	1.463	0.144	BLQ
	Esophagus Wall	4.928	0.419	0.127	0.075	BLQ	BLQ
	Large Intestine Wall	4.019	9.880	0.971	0.226	0.095	BLQ
	Large Intestine (contents)	1.188	54.829	8.988	1.732	0.079	BLQ
	Oral Mucosa	2.620	0.244	0.316	0.110	BLQ	BLQ
	Small Intestine (wall)	27.616	0.867	0.512	0.326	0.075	BLQ
	Small Intestine (contents)	48.340	2.718	0.292	0.128	0.066	BLQ
	Stomach Wall (glandular)	3.745	0.467	0.300	0.126	0.084	BLQ
	Stomach Wall (non-glandular)	9.095	0.481	0.313	0.212	BLQ	BLQ
	Stomach (contents)	156.944	0.139	0.117	BLQ	0.090	BLQ

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.1　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

		Concentration (nmol equiv/g)[a,b]					
Tissue Type	**Tissue**	**1 h**	**6 h**	**10 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Ocular	Eye	1.160	0.104	0.078	BLQ	BLQ	BLQ
	Eye (lens)	0.087	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Eye (uveal tract)	4.867	0.582	0.130	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ=below the limit of quantitation; h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; NS=no sample; PO=oral(ly); QWBA=quantitative whole body autoradiography.

[a] BLQ (QWBA) ≤0.0637 nmol equiv/g tissue (QWBA).

[b] BLQ (LSC)≤0.0284 nmol equiv/g (plasma) or <0.0359 nmol equiv/g (blood).

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.2　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.3.1: PK021]					
Species / Strain		Rat / Long-Evans					
Gender / Number of Animals		M / 6 (1 per time point)					
Feeding Condition		Fasted					
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 in water / solution					
Method of Administration		PO					
Dose (mg/kg) / (µCi/kg)		3 / 85.8					
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)		[^{14}C]ISL / 165.66					
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		28.65					
Analyte		Radioactivity					
Method of Analysis		QWBA, LSC					
Sampling Times		1, 6, 10, 24, 72, and 168 h (postdose)					
Tissue Type	**Tissue**	**Tissue to Plasma Ratio**					
		1 h	**6 h**	**10 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Vascular / Lymphatic	Plasma (LSC)	1.00	1.00	1.00	1.00	NA	NA
	Blood (LSC)	0.74	1.03	1.20	1.29	NA	NA
	Aorta	1.72	2.24	2.73	2.92	NA	NA
	Blood (cardiac)	0.90	0.84	1.21	NA	NA	NA
	Bone Marrow (femur)	1.39	2.37	3.19	3.59	NA	NA
	Lymph Node (axillary)	NA	NA	5.76	NA	NA	NA
	Lymph Node (brachial)	12.13	NA	21.32	13.89	NA	NA

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.2　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Tissue to Plasma Ratio					
		1 h	6 h	10 h	24 h	72 h	168 h
Vascular / Lymphatic, Continued	Lymph Node (cervical)	10.03	20.90	9.96	14.63	NA	NA
	Lymph Node (inguinal)	4.86	12.92	14.36	11.73	NA	NA
	Lymph Node (parathymic)	5.98	NA	17.21	9.77	NA	NA
	Lymph Node (popliteal)	NA	NA	11.79	6.02	NA	NA
	Lymph Node (sciatic)	2.21	13.97	11.99	7.84	NA	NA
	Lymph Node (submandibular)	8.92	12.54	11.84	20.85	NA	NA
	Spleen	4.97	8.82	10.50	11.06	NA	NA
	Thymus	4.69	6.04	6.63	6.22	NA	NA
Excretory / Metabolic	Kidney	5.90	5.62	5.92	6.79	NA	NA
	Kidney (cortex)	6.06	6.07	6.78	7.37	NA	NA
	Kidney (medulla)	5.21	4.34	4.43	5.48	NA	NA
	Liver	7.06	14.44	13.34	10.22	NA	NA
	Urinary Bladder Wall	71.34	165.25	5.64	5.20	NA	NA
Central Nervous System	Brain (whole)	0.15	NA	NA	NA	NA	NA
	Brain (cerebellum)	0.16	NA	NA	NA	NA	NA
	Brain (cerebrum)	0.20	NA	NA	NA	NA	NA
	Brain (medulla)	0.06	NA	NA	NA	NA	NA
	Spinal Cord	0.16	0.73	0.83	NA	NA	NA

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.2　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Tissue to Plasma Ratios					
		1 h	6 h	10 h	24 h	72 h	168 h
Endocrine	Adrenal Gland	1.36	2.14	1.55	3.43	NA	NA
	Adrenal Cortex	1.38	2.10	1.55	3.62	NA	NA
	Adrenal Medulla	1.30	2.48	1.68	3.77	NA	NA
	Pituitary Gland	0.74	0.90	1.65	NA	NA	NA
	Thyroid Gland	1.84	1.84	1.95	1.74	NA	NA
Secretory	Exorbital Lacrimal Gland	0.94	2.48	2.08	1.70	NA	NA
	Harderian Gland	0.87	2.81	4.29	4.01	NA	NA
	Intraorbital Lacrimal Gland	0.82	1.87	1.36	1.60	NA	NA
	Pancreas	1.40	4.31	3.33	3.11	NA	NA
	Salivary Gland	0.93	2.20	1.05	NA	NA	NA
Fatty	Abdominal Fat	0.54	1.06	1.52	2.24	NA	NA
	Brown Fat	1.60	3.07	2.14	5.97	NA	NA
Dermal	Skin (non-pigmented)	1.13	3.33	2.29	3.94	NA	NA
	Skin (pigmented)	2.04	8.38	10.99	4.64	NA	NA
Reproductive	Epididymis	0.89	1.78	2.24	2.50	NA	NA
	Prostate Gland	0.89	2.34	3.28	3.84	NA	NA
	Seminal Vesicles	0.86	2.32	2.66	1.98	NA	NA
	Testis	0.68	1.81	2.44	2.82	NA	NA

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.2　雄性 Long-Evans ラット（部分有色ラット）に単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Tissue to Plasma Ratios					
		1 h	6 h	10 h	24 h	72 h	168 h
Skeletal / Muscular	Bone (femur)	0.41	1.22	1.09	1.81	NA	NA
	Diaphragm	1.38	1.68	2.30	3.92	NA	NA
	Heart	1.51	2.00	2.46	1.96	NA	NA
	Muscle (femoral)	1.09	1.06	2.07	2.80	NA	NA
Respiratory	Lung	1.35	2.55	3.86	3.69	NA	NA
	Nasal Turbinates	0.30	1.07	NA	NA	NA	NA
	Trachea	1.12	1.37	1.84	NA	NA	NA
Gastrointestinal Tract	Cecum Mucosa	2.45	24.25	8.02	10.65	NA	NA
	Esophagus Wall	1.76	2.75	1.57	1.78	NA	NA
	Large Intestine Wall	1.44	64.72	12.00	5.38	NA	NA
	Oral Mucosa	0.94	1.60	3.91	2.63	NA	NA
	Small Intestine (wall)	9.88	5.68	6.33	7.77	NA	NA
	Stomach Wall (glandular)	1.34	3.06	3.71	3.01	NA	NA
	Stomach Wall (non-glandular)	3.25	3.15	3.87	5.05	NA	NA
Ocular	Eye	0.42	0.68	0.96	NA	NA	NA
	Eye (lens)	0.03	NA	NA	NA	NA	NA
	Eye (uveal tract)	1.74	3.81	1.61	NA	NA	NA

h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; NA=not applicable; PO=oral(ly); QWBA=quantitative whole body autoradiography.

C Confidential

2.6.5.6 ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.3 雄性 Wistar Han ラットに単回経口投与した際の組織中放射能濃度

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.3.1: PK021]	
Species / Strain		Rat / Wistar Han	
Gender / Number of Animals		M / 2 (1 per time point)	
Feeding Condition		Fasted	
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 in water / solution	
Method of Administration		PO	
Dose (mg/kg) / (µCi/kg)		3 / 85.8	
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)		[^{14}C]ISL / 165.66	
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		28.65	
Analyte		Radioactivity	
Method of Analysis		QWBA, LSC	
Sampling Times		1 and 168 h (postdose)	
Tissue Type	**Tissue**	**Concentration (nmol equiv/g)[a,b]**	
		1 h	**168 h**
Vascular / Lymphatic	Plasma (LSC)	2.889	BLQ
	Blood (LSC)	2.209	BLQ
	Aorta	5.443	BLQ
	Blood (cardiac)	2.374	BLQ
	Bone Marrow (femur)	6.500	BLQ
	Lymph Node (brachial)	18.785	NS
	Lymph Node (cervical)	25.780	BLQ
	Lymph Node (inguinal)	18.994	NS
Vascular / Lymphatic	Lymph Node (sciatic)	18.487	NS
	Lymph Node (submandibular)	25.023	BLQ
	Spleen	21.084	BLQ
	Thymus	12.790	BLQ
Excretory / Metabolic	Kidney	18.297	BLQ
	Kidney (cortex)	17.497	BLQ
	Kidney (medulla)	20.912	BLQ
	Liver	18.359	BLQ
	Urinary Bladder Wall	85.489	BLQ
	Urinary Bladder contents	307.973	BLQ
Central Nervous System	Brain (whole)	0.292	BLQ
	Brain (cerebellum)	0.267	BLQ
	Brain (cerebrum)	0.489	BLQ
	Brain (medulla)	0.105	BLQ
	Spinal Cord	0.575	BLQ

2.6.5.6 ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.3 雄性 Wistar Han ラットに単回経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Concentration (nmol equiv/g)[a,b]	
		1 h	168 h
Endocrine	Adrenal Gland	4.595	BLQ
	Adrenal Cortex	4.648	BLQ
	Adrenal Medulla	4.359	BLQ
	Pituitary Gland	2.807	BLQ
	Thyroid Gland	5.242	BLQ
Secretory	Exorbital Lacrimal Gland	3.202	BLQ
	Harderian Gland	2.33	BLQ
	Intraorbital Lacrimal Gland	2.951	BLQ
	Pancreas	5.430	BLQ
	Salivary Gland	3.128	BLQ
Fatty	Abdominal Fat	0.789	BLQ
	Brown Fat	6.099	BLQ
Dermal	Skin (non-pigmented)	4.355	BLQ
Reproductive	Epididymis	2.775	BLQ
	Prostate Gland	3.800	BLQ
	Seminal Vesicles	2.615	BLQ
	Testis	1.944	BLQ
Skeletal / Muscular	Bone (femur)	2.520	BLQ
	Diaphragm	5.021	BLQ
	Heart	5.950	BLQ
	Muscle (femoral)	3.597	BLQ
Respiratory	Lung	3.754	BLQ
	Nasal Turbinates	1.059	BLQ
	Trachea	4.516	BLQ
Gastrointestinal Tract / Contents	Cecum Mucosa	10.822	BLQ
	Cecum (contents)	4.305	0.081
	Esophagus Wall	3.195	BLQ
	Large Intestine Wall	7.352	BLQ
	Large Intestine (contents)	29.778	0.070
	Oral Mucosa	3.145	BLQ
	Small Intestine (wall)	42.332	BLQ
	Small Intestine (contents)	78.820	BLQ
	Stomach Wall (glandular)	6.405	BLQ
	Stomach Wall (non-glandular)	5.808	BLQ
	Stomach (contents)	37.588	BLQ

2.6.5.6 ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.3 雄性 Wistar Han ラットに単回経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Concentration (nmol equiv/g)[a,b]	
		1 h	168 h
Ocular	Eye	1.096	BLQ
	Eye (lens)	0.134	BLQ
	Eye (uveal tract)	2.737	BLQ

BLQ=below the limit of quantitation; h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; NS=no sample; PO=oral(ly); QWBA=quantitative whole body autoradiography.

[a] BLQ (QWBA) ≤0.0637 nmol equiv/g tissue (QWBA).

[b] BLQ (LSC) ≤0.0284 nmol equiv/g (plasma) or <0.0359 nmol equiv/g (blood).

2.6.5.6 ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.4 雄性 Wistar Han ラットに単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.3.1: PK021]	
Species / Strain		Rat / Wistar Han	
Gender / Number of Animals		M / 2 (1 per time point)	
Feeding Condition		Fasted	
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 in water / solution	
Method of Administration		PO	
Dose (mg/kg) / (µCi/kg)		3/85.8	
Radionuclide/ Specific Activity (µCi/mg)		[^{14}C]ISL / 165.66	
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		28.65	
Analyte		Radioactivity	
Method of Analysis		QWBA, LSC	
Sampling Times		1 and 168 h (postdose)	
Tissue Type	**Tissue**	**Tissue to Plasma Ratio**	
		1 h	**168 h**
Vascular / Lymphatic	Plasma (LSC)	1.00	NA
	Blood (LSC)	0.76	NA
	Aorta	1.88	NA
	Blood (cardiac)	0.82	NA
	Bone Marrow (femur)	2.25	NA
	Lymph Node (brachial)	6.50	NA
	Lymph Node (cervical)	8.92	NA
	Lymph Node (inguinal)	6.58	NA
Vascular / Lymphatic, Continued	Lymph Node (sciatic)	6.40	NA
	Lymph Node (submandibular)	8.66	NA
	Spleen	7.30	NA
	Thymus	4.43	NA
Excretory / Metabolic	Kidney	6.33	NA
	Kidney (cortex)	6.06	NA
	Kidney (medulla)	7.24	NA
	Liver	6.36	NA
	Urinary Bladder Wall	29.60	NA
Central Nervous System	Brain (whole)	0.10	NA
	Brain (cerebellum)	0.09	NA
	Brain (cerebrum)	0.17	NA
	Brain (medulla)	0.04	NA
	Spinal Cord	0.20	NA
Endocrine	Adrenal Gland	1.59	NA

2.6.5.6 ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.4 雄性 Wistar Han ラットに単回経口投与した際の放射能濃度比（組織／血漿）（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Tissue to Plasma Ratio	
		1 h	168 h
Endocrine	Adrenal Cortex	1.61	NA
	Adrenal Medulla	1.51	NA
	Pituitary Gland	0.97	NA
	Thyroid Gland	1.81	NA
Secretory	Exorbital Lacrimal Gland	1.11	NA
	Harderian Gland	0.81	NA
	Intraorbital Lacrimal Gland	1.02	NA
	Pancreas	1.88	NA
	Salivary Gland	1.08	NA
Fatty	Abdominal Fat	0.27	NA
	Brown Fat	2.11	NA
Dermal	Skin (non-pigmented)	1.51	NA
Reproductive	Epididymis	0.96	NA
	Prostate Gland	1.32	NA
	Seminal Vesicles	0.91	NA
	Testis	0.67	NA
Skeletal/ Muscular	Bone (femur)	0.87	NA
	Diaphragm	1.74	NA
	Heart	2.06	NA
	Muscle (femoral)	1.25	NA
Respiratory	Lung	1.30	NA
	Nasal Turbinates	0.37	NA
	Trachea	1.56	NA
Gastrointestinal Tract	Cecum Mucosa	3.75	NA
	Esophagus Wall	1.11	NA
	Large Intestine Wall	2.55	NA
	Oral Mucosa	1.09	NA
	Small Intestine (wall)	14.66	NA
	Stomach Wall (glandular)	2.22	NA
	Stomach Wall (non-glandular)	2.01	NA
Ocular	Eye	0.38	NA
	Eye (lens)	0.05	NA
	Eye (uveal tract)	0.95	NA

h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; NA=not applicable; PO=oral(ly); QWBA=quantitative whole body autoradiography.

2.6.5.6 ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.5 雄性 Wistar Han ラットに28日間反復経口投与した際の組織中放射能濃度

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.3.2: PK006]						
Species / Strain		Rat / Wistar Han						
Gender / Number of Animals		M / 7 (1 per time point)						
Feeding Condition		Fasted						
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 in water / solution						
Method of Administration		PO						
Dose (mg/kg/day) / (µCi/kg/day)		50 / 100						
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)		[^{14}C]ISL / 168.2						
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		2.12						
Analyte		Radioactivity						
Method of Analysis		QWBA, LSC						
Sampling Times		0.5 h, 24 h, 7, 14, 28, 36, and 58 days (post first dose)						
Tissue Type	**Tissue**	**Concentration (nmol equiv/g)[a]**						
		0.5 h	**24 h**	**7 days**	**14 days**	**28 days**	**36 days**	**58 day**
Vascular / Lymphatic	Plasma (LSC)[b]	26.95	BLQ	3.26	6.60	6.01	BLQ	BLQ
	Blood	32.09	BLQ	6.23	13.04	17.66	9.67	3.49
	Bone Marrow	35.01	2.27	7.27	14.19	13.46	2.81	BLQ
	Lymph Node (brachial)	75.17	12.12	25.57	38.54	ND	10.64	ND
	Lymph Node (inguinal)	73.58	12.71	22.42	43.69	33.32	ND	ND
	Lymph Node (sciatic)	85.63	ND	29.04	53.44	ND	ND	ND
	Lymph Node (submandibular)	69.04	8.37	19.43	34.33	40.26	7.97	3.21
	Spleen	66.43	14.04	26.06	46.56	42.28	8.66	5.81
	Thymus	46.17	3.76	19.50	26.07	23.51	2.26	BLQ

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.5　雄性 Wistar Han ラットに 28 日間反復経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Concentration (nmol equiv/g)[a]						
		0.5 h	24 h	7 days	14 days	28 days	36 days	58 days
Excretory / Metabolic	Kidney	221.66	5.92	25.52	57.11	33.28	6.50	BLQ
	Kidney (cortex)	146.83	5.85	23.81	53.26	35.05	7.35	BLQ
	Kidney (medulla)	572.36	5.57	29.45	63.99	25.04	4.38	BLQ
	Liver	84.09	10.12	30.63	43.41	58.64	7.83	BLQ
Central Nervous System	Brain (cerebellum)	BLQ	BLQ	BLQ	2.06	3.83	2.20	BLQ
	Brain (cerebrum)	BLQ	BLQ	BLQ	1.98	3.43	BLQ	BLQ
	Brain (medulla)	BLQ	BLQ	BLQ	2.66	ND	2.30	BLQ
	Brain (olfactory lobe)	BLQ	BLQ	BLQ	2.42	3.27	BLQ	BLQ
	Spinal Cord	BLQ	BLQ	BLQ	3.21	3.63	3.39	BLQ
Endocrine	Adrenal Gland	46.88	2.87	7.21	11.14	11.18	5.97	4.80
	Pituitary Gland	29.46	BLQ	4.80	3.55	10.80	2.20	BLQ
	Harderian Gland	34.35	2.08	10.97	16.65	12.13	2.74	BLQ
Secretory	Pancreas	43.75	2.49	7.89	12.88	18.02	4.08	BLQ
	Salivary Gland	35.60	BLQ	6.96	9.77	14.85	3.92	BLQ
Fatty	Abdominal Fat	13.80	BLQ	4.16	13.14	9.65	6.01	6.18
	Brown Fat	79.33	6.85	24.35	36.91	38.95	29.02	10.80
Dermal	Skin (non-pigmented)	37.01	BLQ	7.31	13.58	14.71	7.49	5.11
Reproductive	Epididymis	31.18	2.44	5.54	11.87	14.37	4.24	BLQ
	Seminal Vesicles	33.20	1.92	7.98	7.26	ND	4.68	3.49
	Testis	14.79	3.30	6.04	11.66	14.65	2.81	BLQ

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）
2.6.5.6.5　雄性 Wistar Han ラットに 28 日間反復経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Concentration (nmol equiv/g)[a]						
		0.5 h	24 h	7 days	14 days	28 days	36 days	58 days
Skeletal / Muscular	Bone	6.78	BLQ	2.60	2.70	2.99	2.42	BLQ
	Myocardium	37.27	2.60	10.58	18.16	23.37	7.37	BLQ
	Muscle	31.58	1.98	9.07	19.49	22.06	13.68	3.55
Teeth	Lower incisor - root dentin	19.60	BLQ	13.48	33.52	12.86	BLQ[c]	BLQ
	Lower incisor - root enamel	44.78	ND	ND	12.29	2.89	BLQ[c]	BLQ
	Lower incisor - root pulp	76.30	BLQ	7.79	40.14	17.84	3.85[c]	3.96
	Molars - dentin	26.23	BLQ	5.80	6.26	9.65[c]	2.08	BLQ
	Molars - enamel	ND	ND	ND	BLQ	ND	BLQ	BLQ
	Molars - pulp	70.03	ND	3.76	4.56	30.78[c]	4.42	BLQ
	Upper incisor - root dentin	8.35	BLQ	12.07	30.78	14.91[c]	2.18	BLQ
	Upper incisor - root enamel	33.40	BLQ	4.08	10.01	11.68[c]	BLQ[c]	BLQ
	Upper incisor - root pulp	71.98	BLQ	10.59	30.84	27.83[c]	4.42	BLQ
Respiratory	Lung	34.65	3.66	9.03	14.73	19.35	6.86	BLQ
	Nasal Turbinates	7.87	BLQ	6.32	10.76	16.20	5.19	4.20
Gastrointestinal Tract	Cecum Mucosa	44.01	3.75	10.05	22.52	11.36	2.81	2.38
	Large Intestine Wall	48.45	6.90	11.83	19.07	28.35	3.33	BLQ
	Small Intestine	66.33	2.26	16.20	20.60	13.46	BLQ	6.96
	Stomach Wall	50.39	BLQ	10.94	15.16	12.07	4.96	BLQ
Ocular	Eye	BLQ	BLQ	BLQ	2.83	2.85	2.26	BLQ

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）
2.6.5.6.5　雄性 Wistar Han ラットに 28 日間反復経口投与した際の組織中放射能濃度（続き）

Test Article: ISL

BLQ=below the limit of quantitation; h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; ND=not determined (tissue not captured or not distinguishable from surround tissues); PO=oral(ly); QWBA=quantitative whole body autoradiography.

[a] BLQ (QWBA)=2 nmol equiv/g tissue or blood.

[b] BLQ (LSC)=1.35 nmol equiv/g plasma.

[c] Concentration value based on one tissue section from one rat per time point. All other concentration values based on an average from 2 or more tissue sections from one rat per time point.

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.6　雄性 Wistar Han ラットに28日間反復経口投与した際の主要組織中放射能の投与放射能に対する推定割合

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.3.2: PK006]						
Species / Strain		Rats / Wistar Han						
Gender / Number of Animals		M / 7 (1 per time point)						
Feeding Condition		Fasted						
Vehicle/Formulation		10% Tween 80 in water / solution						
Method of Administration		PO						
Dose (mg/kg/day / µCi/kg/day)		50 / 100						
Radionuclide/Specific Activity (µCi/mg)		[^{14}C]ISL / 168.2						
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		2.12						
Analyte		Radioactivity						
Method of Analysis		QWBA, LSC						
Sampling Times		0.5 h, 24 h, 7, 14, 28, 36, and 58 days (post first dose)						
Tissue Type	**Tissue**	**Estimated Percent of Daily Radioactive Dose[a,b]**						
		0.5 h	**24 h**	**7 days**	**14 days**	**28 days**	**36 days**	**58 days**
Vascular / Lymphatic	Blood	1.26	BLQ	0.24	0.68	1.34	0.64	0.01
	Bone Marrow	0.45	0.03	0.09	0.24	0.34	0.06	BLQ
	Spleen	0.07	0.02	0.03	0.07	0.09	0.02	<0.01
Excretory / Metabolic	Kidney	0.91	0.02	0.10	0.31	0.26	0.04	BLQ
	Liver	1.72	0.21	0.62	1.19	2.33	0.27	BLQ
Central Nervous System	Brain (cerebellum)	BLQ	BLQ	BLQ	<0.01	<0.01	<0.01	BLQ
	Brain (cerebrum)	BLQ	BLQ	BLQ	<0.01	0.01	BLQ	BLQ
Endocrine	Adrenal Gland	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.6.5.6 ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.6 雄性 Wistar Han ラットに 28 日間反復経口投与した際の主要組織中放射能の投与放射能に対する推定割合（続き）

Test Article: ISL

Tissue Type	Tissue	Estimated Percent of Daily Radioactive Dose[a,b]						
		0.5 h	**24 h**	**7 days**	**14 days**	**28 days**	**36 days**	**58 days**
Secretory	Pancreas	0.08	<0.01	0.01	0.03	0.06	0.01	BLQ
Fatty	Fat	0.54	BLQ	0.16	0.69	0.73	0.40	0.02
Dermal	Skin	3.94	BLQ	0.77	1.93	3.03	1.35	0.04
Skeletal/ Muscular	Heart	0.07	<0.01	0.02	0.04	0.08	0.02	BLQ
	Skeletal Muscle	7.15	0.45	2.04	5.90	9.66	5.24	0.06
Respiratory	Lung	0.10	0.01	0.03	0.06	0.10	0.03	BLQ
Total[c]		**16.30**	**0.74**	**4.13**	**11.16**	**18.05**	**8.09**	**0.12**

BLQ=below the limit of quantitation; h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; PO=oral(ly); QWBA=quantitative whole body autoradiography.

[a] Estimated percent of [^{14}C]ISL dose, in major tissues following multiple PO dosing of 50 mg/kg/day for 28 days in M Wistar Han, by QWBA using literature values for average percent body weights for major organs.

[b] BLQ (QWBA) ≤2 nmol equiv/g tissue or blood.

[c] Percent of body weight accounted for (total weight of all major tissues listed above): 82%. Estimated based on the following average organ weights in rats (adrenals 0.02%, blood 7%, bone marrow 2.1%, cerebellum 0.08%, cerebrum 0.30%, fat 7%, heart 0.33%, kidneys 0.73%, liver 3.66%, lungs 0.5%, skeletal muscle 40.43%, pancreas 0.32%, skin 19.03%, spleen 0.2%) [4.3: 04G7V0] .

C Confidential

2.6.5.6　ラットにおける組織分布（続き）

2.6.5.6.7　ラットに[redacted]ISL を単回静脈内投与した際の組織分布

Test Articles: ISL

Study Number	[4.2.2.3.3: PK017]
Species / Strain	Rat / Wistar Han
Gender / Number of Animals	M / 3
Feeding Condition	NS
Vehicle / Formulation	Saline with 92% of 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and 8% ethanol solution
Method of Administration	IV
Dose (µg/mCi)	Less than 0.1 / 1
Radionuclide / Molar activity (Ci / mmol)	[redacted]ISL / 8,000
Analyte	Radioactivity
Method of Analysis	PET
Sampling Times (Postdose Administration)	0 to 180 min
Tissue	**[redacted]ISL Total Volume of Distribution[a,b]** **Mean[c]**
Submandibular Lymph Node	40.7 ± 5.8
Cervical Lymph Node	35.1 ± 4.9
Brachia Lymph Node	60.8 ± 4.9

ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); M=male; min=minute(s); n=number; NS=not specified; PET=positron emission tomography.

Note: From 60 to 180 min postdose, the majority of [redacted]ISL related material was observed in the teeth, wrist, shoulder, and spine areas while no radioactivity was detected in the brain.

[a] [redacted]ISL total tissue distribution volumes were determined by 1 tissue compartmental modeling analysis for lymph nodes following a single IV administration of [redacted]ISL (1 mCi) in rats using a 10% blood volume by PET.

[b] Volume of distribution is the partition of coefficient between total concentration of [redacted]ISL related material in tissue and total concentration of [redacted]ISL related material in plasma.

[c] Values are shown as mean ± standard deviation (n=3).

C Confidential

2.6.5.7　サルに[redacted]ISL を単回静脈内投与した際の組織分布

Test Articles: ISL

Study Number	[4.2.2.3.4: PK018]
Species / Strain	Monkey / Rhesus
Gender / Number of Animals	M / 1
Feeding Condition	Fasted
Vehicle / Formulation	Saline with 92% of 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) and 8% ethanol / solution
Method of Administration	IV
Dose (ng/mCi)	Less than 1 ng / 10.9 mCi
Radionuclide / Molar Activity (Ci/mmol)	[redacted]ISL / 16,000
Analyte	Radioactivity
Method of Analysis	PET
Sampling Times (Postdose Administration)	1 to 182 min

Tissue Concentrations of Total [redacted]ISL-Related Material in Standard Uptake Value Units

Time (min)	**1.0**	**3.0**	**5.2**	**7.7**	**11.1**	**15.0**	**19.3**	**23.2**	**28.1**	**34.3**	**41.0**	**47.8**	**54.0**	**6.40**	**67.0**	**76.1**	**87.3**	**98.6**	**110.2**	**121.4**	**137.6**	**159.8**	**181.9**
Liver	1.14	5.84	4.37	3.36	2.74	2.35	2.12	1.96	1.85	1.77	1.73	1.68	1.65	1.61	1.59	1.55	1.52	1.50	1.48	1.44	1.42	1.37	1.33
Kidney Cortex	11.30	9.27	9.08	8.95	8.32	6.55	5.24	4.48	4.02	3.52	3.12	2.88	2.69	2.57	2.41	2.31	2.15	2.01	1.91	1.88	1.88	1.77	1.65
Heart	13.92	4.32	3.38	2.62	2.00	1.63	1.39	1.26	1.18	1.09	1.02	0.97	0.93	0.90	0.87	0.83	0.78	0.75	0.70	0.67	0.63	0.57	0.52
Gall Bladder	1.38	3.43	2.56	2.10	2.17	2.68	3.69	4.81	5.40	5.98	6.44	7.12	7.53	8.19	8.83	9.50	10.34	11.00	11.55	11.88	12.17	12.24	12.05
Bladder	0.79	0.82	0.80	0.78	2.27	4.93	7.42	9.68	11.94	14.46	16.87	19.57	21.63	23.65	25.15	26.70	27.45	27.03	26.35	26.62	28.04	29.51	29.97
Spine	1.09	1.51	1.61	1.65	1.74	1.87	1.99	2.08	2.20	2.38	2.52	2.68	2.81	2.90	3.03	3.17	3.32	3.42	3.57	3.66	3.80	3.96	4.08
Cervical LN	0.01	1.92	1.88	1.87	1.75	1.64	1.56	1.48	1.46	1.34	1.38	1.33	1.31	1.35	1.35	1.30	1.31	1.30	1.27	1.30	1.29	1.26	1.23

C Confidential

2.6.5.7 サルに[redacted]ISL を単回静脈内投与した際の組織分布（続き）

Test Articles: ISL

Tissue Concentrations of Total [redacted] ISL-Related Material in Standard Uptake Value Units																						
Time (min)	**1.0**	**3.0**	**5.2**	**7.7**	**11.1**	**15.0**	**19.3**	**23.2**	**28.1**	**34.3**	**41.0**	**47.8**	**54.0**	**6.40**	**67.0**	**76.1**	**87.3**	**98.6**	**110.2**	**121.4**	**137.6**	**159.8**	**181.9**
Thoracic LN	0.01	1.02	1.03	1.07	1.09	1.06	1.05	1.05	1.03	1.00	0.99	0.98	0.94	0.94	0.89	0.89	0.86	0.85	0.82	0.78	0.77	0.75	0.70
Axillary LN	0.83	1.26	1.27	1.19	1.10	0.98	0.98	0.97	0.97	0.98	0.94	0.94	0.92	0.94	0.93	0.94	0.96	0.95	0.94	0.97	0.95	0.94	0.94
Inguinal LN	1.62	1.32	1.36	1.20	1.12	1.08	1.08	1.07	1.07	1.09	1.09	1.03	1.07	1.08	1.00	1.03	1.01	1.03	1.05	1.03	0.99	0.99	0.96
Testes	0.72	0.87	0.96	1.07	1.14	1.18	1.21	1.24	1.27	1.29	1.30	1.34	1.36	1.38	1.38	1.40	1.42	1.42	1.42	1.41	1.41	1.40	1.37
Brain	0.01	0.14	0.10	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05
Nasal Cavity	0.01	1.37	1.10	0.96	0.81	0.71	0.65	0.61	0.59	0.57	0.56	0.54	0.54	0.54	0.52	0.52	0.51	0.51	0.50	0.50	0.50	0.49	0.50
Knuckles	1.88	1.73	1.76	1.73	1.71	1.68	1.69	1.72	1.74	1.78	1.81	1.84	1.86	1.89	1.91	1.93	1.97	1.99	1.98	1.99	2.01	2.01	2.00
ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); L=lymph node; min=minute(s); PET=positron emission tomography.																							

C Confidential

2.6.5.8 ラットにおける胎盤通過性

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.10: TT[redacted]7190]			
Species / Strain	Rat / Wistar Hann			
Gestation Day / Number of Animals	20 / 8 per dose (4 per time point)			
Feeding Condition	Fed			
Vehicle/Formulation[a]	10% (w/w) polysorbate 80 in deionized water / suspension			
Method of Administration	PO			
Analyte	ISL			
Assay	LC-MS/MS			
Dose (mg/kg/day)	3		50	
Matrix	**Time point (h)**[b]		**Time point (h)**[b]	
	0.5	**1**	**0.5**	**1**
Maternal Plasma (µM)	1.57 ± 0.193	1.05 ± 0.106	15.1 ± 3.03	13.9 ± 1.57
Fetal Plasma (µM)	0.882 ± 0.118	0.912 ± 0.051	6.75 ± 1.07	9.69 ± 0.967
Fetal/Maternal Concentration Ratio[c]	0.562 ± 0.0210	0.877 ± 0.041	0.463 ± 0.029	0.701 ± 0.021

h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; n=number; PO=oral(ly).

Note: ISL was administered orally to female Wistar Han rats at 3 and 50 mg/kg/day from gestation day 6 through 20. Plasma concentrations of ISL were determined in maternal and fetal samples collected at 0.5- and 1-h postdose on gestation day 20.

[a] Polysorbate 80=Tween 80.

[b] Values represent mean ± standard error of the mean (n=4).

[c] Fetal/maternal plasma concentration ratios were calculated by dividing the individual fetal plasma concentration by the corresponding maternal plasma concentration. Mean and standard error values of the ratio were calculated from the ratios determined from individual subjects.

Confidential

2.6.5.9 In vitro における ISL 及び M4の血漿蛋白質との結合

Test Articles: ISL, ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.3.6: PK009] [4.2.2.3.7: PK011]				
Study System	In vitro				
Species / Matrix	Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, Human/plasma				
Method	Equilibrium dialysis				
Analyte	ISL or ISL metabolite M4				
Assay	LC-MS/MS				
Compound	**Species**	**Unbound Fraction in Plasma[a,b]**			**Study Number**
		0.1 µM	**1 µM**	**10 µM**	**Mean[c]**	
ISL	Mouse	0.963 ± 0.102	0.950 ± 0.067	0.976 ± 0.061	0.963 ± 0.013	[4.2.2.3.6: PK009]
	Rat	0.991 ± 0.080	0.800 ± 0.082	0.994 ± 0.040	0.928 ± 0.111	[4.2.2.3.5: PK002]
	Rabbit	0.844 ± 0.092	0.834 ± 0.051	0.797 ± 0.049	0.825 ± 0.025	[4.2.2.3.6: PK009]
	Monkey	0.867 ± 0.046	0.835 ± 0.032	0.863 ± 0.035	0.855 ± 0.017	[4.2.2.3.5: PK002]
	Human	0.962 ± 0.044	0.952 ± 0.022	0.991 ± 0.022	0.968 ± 0.020	
M4	Mouse	0.957 ± 0.182	0.992 ± 0.082	0.934 ± 0.143	0.961 ± 0.029	[4.2.2.3.7: PK011]
	Rat	0.952 ± 0.033	0.967 ± 0.063	0.996 ± 0.058	0.972 ± 0.022	
	Rabbit	0.864 ± 0.114	0.859 ± 0.108	0.823 ± 0.163	0.849 ± 0.022	
	Monkey	0.853 ± 0.048	0.911 ± 0.088	0.962 ± 0.037	0.909 ± 0.055	
	Human	0.958 ± 0.082	0.925 ± 0.043	0.925 ± 0.076	0.936 ± 0.019	

h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; n=number.

Note: Plasma samples containing the specified concentrations of ISL or M4 (3 to 6 replicates per concentration) were incubated at 37°C in 5% CO_2, for at least 5 h in dialysis plates to ensure that equilibrium between the plasma and buffer chamber was achieved. Aliquots were then taken from each chamber and analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3 or n=6).

[b] Unbound fraction was determined using the following equation: $Unbound\ fraction = \frac{Concentration\ in\ buffer\ chamber}{Concentration\ in\ plasma\ chamber}$.

[c] Average unbound fraction=mean ± standard deviation of the unbound fractions measured at 0.1, 1.0, and 10 µM.

2.6.5.10 血液／血漿分配比

Test Articles: ISL, ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.3.8: PK010] [4.2.2.3.7: PK011]				
Study System	In vitro				
Species / Matrix	Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, Human/fresh blood and plasma				
Analyte	ISL or ISL metabolite M4				
Assay	LC-MS/MS				
Compound	**Species**	**Blood-to-Plasma Concentration Ratio[a,b]**			**Mean[c]**	**Study Number**
		0.1 µM	**1 µM**	**10 µM**		
ISL	Mouse	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	[4.2.2.3.8: PK010]
	Rat	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.0	[4.2.2.3.5: PK002]
	Rabbit	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.1	[4.2.2.3.8: PK010]
	Monkey	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.2	[4.2.2.3.5: PK002]
	Human	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	
M4	Mouse	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	[4.2.2.3.7: PK011]
	Rat	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.1	
	Rabbit	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	
	Monkey	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	
	Human	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.1	

B=blood; EDTA=ethylenediamine tetra acetic acid; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); n=number; P=plasma; SE=standard error; SEM=standard error of the mean.

Note: The partitioning of ISL into blood cells was determined in incubations with fresh whole blood treated with EDTA. Three replicates of fresh blood containing the specified concentrations of ISL or M4 were incubated at 37°C for 30 to 60 min. The samples were then centrifuged at 1750 to 3000 × g and aliquots of plasma were taken for analysis. ISL concentration in these aliquots was compared against ISL concentration in aliquots of plasma that were treated with ISL or M4 and used as surrogate of whole blood.

[a] Values represent mean ± SE or EM (n=3).

[b] The blood-to-plasma distribution ratio was determined according to the equation: $\frac{B}{P} ratio = \frac{Islatravir\ or\ M4\ concentration\ in\ "whole\ blood"}{ISL\ or\ M4\ cocentration\ in\ plasma\ separated\ from\ blood}$.

[c] Mean concentration ratio=mean ± standard deviation of the blood-to-plasma concentration ratios measured at 0.1, 1.0, and 10 µM.

C Confidential

2.6.5.11 In vitro における[^{14}C]ISL のヒト PBMC への取込み

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.9: PK031]				
Type of Study	In vitro uptake into human PBMCs				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL into freshly isolated PBMCs				
Analytes	[^{14}C]ISL, [^{3}H]Uridine				
Assay	LSC				
Substrate	**Sodium Condition**	**Inhibitor**	**Inhibitor Concentration (µM)**	**Time (min)**	**PBMC (pmol/10^{6} cells)[a]**
[^{3}H]Urindine	Plus	-	0	30	21.376 ± 2.041
	Plus	Cocktail	NA	30	1.451 ± 0.048
	Minus	-	0	30	19.600 ± 1.282
	Minus	NBMPR	10	30	1.516 ± 0.176
[^{14}C]ISL	Plus	-	0	0	4.044 ± 0.394
	Plus	-	0	15	70.889 ± 1.664
	Plus	-	0	30	99.067 ± 3.775
	Plus	Cocktail	NA	30	67.202 ± 0.817
	Plus	NBMPR	10	30	86.358 ± 4.635
	Plus	ISL	1000	30	24.352 ± 0.602
	Minus	-	0	30	52.397 ± 6.572
	Minus	NBMPR	10	30	54.310 ± 4.654

- =no inhibitor; CNT=concentrative nucleoside transporter; ENT=equilibrative nucleoside transporter; KHB=Krebs Henseleit Buffer; min=minute(s); NBMPR=S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine; LSC=liquid scintillation counting; n=number; NA=not applicable; PBMC=peripheral blood mononuclear cell.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (2 µM) into freshly isolated PBMCs was measured in the presence and absence of sodium. [^{3}H]Uridine (1 µM) was used as a positive control substrate of CNT and ENT transporters. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to PBMCs in the absence or presence of a chemical cocktail designed to inhibit CNT and ENT transporters (300 µM gemcitabine + 100 µM adenosine + 10 µM NBMPR) or NBMPR (10 µM), to inhibit endogenous ENT transport, or ISL (1000 µM), followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold sodium-free KHB with NBMPR (10 µM) and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with sodium-free KHB with NBMPR. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Mean ± standard deviation of n=3.

2.6.5.12　In vivo における代謝

2.6.5.12.1　[^{3}H]又は[^{14}C]ISL 経口投与後の動物及びヒトの血漿中・排泄物中における ISL とその代謝物

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.4.1: PK027]	[4.2.2.4.2: PK003]	[4.2.2.4.2: PK003]	[4.2.2.4.1: PK027]	[4.2.2.4.2: PK003]	[5.3.3.1.5: P025]
Species / Strain	Mouse / CD-1	Rat / Wistar Han	Rat / Wistar Han	Rabbit / Dutch Belted	Monkey / Rhesus	Human
Gender / Number of Animals or Subjects	M / 3 (Intact)	M / 3 (Intact)	M / 3 (BDC)	Female / 3 (Intact)	M / 3 (BDC)	M / 6
Feeding Conditions	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle / Formulation	10% Tween 80 / solution	10% Tween 80 / solution	10% Tween 80 / solution	10% Tween 80 / solution	10% Tween 80 / solution	Ora-Blend® / suspension
Method of Administration	PO	PO	PO	PO	PO	PO
Dose	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)	[^{14}C]ISL/174	[^{3}H]ISL/2464	[^{3}H]ISL/2464	[^{14}C]ISL/174	[^{3}H]ISL/2464	[^{14}C]ISL/6.2
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)	49.0	72.5	72.5	19.9	1.4	6.2
Biological Samples	P, U, F	P	B, U	P, U, F	P, U, F	P, U, F
Analytes	ISL and metabolites					
Assays	LC-MS/MS with on-line radiometric detection or off-line radiometric analysis following fractionation of LC column eluents					

C Confidential

2.6.5.12　In vivo における代謝（続き）

2.6.5.12.1　[^{3}H]又は[^{14}C]ISL 経口投与後の動物及びヒトの血漿中・排泄物中における ISL とその代謝物（続き）

Test Article: ISL

	Presence of ISL and Metabolites in Plasma and Excreta from Non-Clinical Species and Human[a,b]																			
Species	Mouse (intact)				Rat (intact[c], BDC[d,e])				Rabbit (intact)				Monkey (BDC)				Human			
Study Number	[4.2.2.4.1: PK027]				[4.2.2.4.2: PK003]				[4.2.2.4.1: PK027]				[4.2.2.4.2: PK003]				[Ref. 5.3.3.1.5: P025]			
Method of Administration	PO				PO				PO				PO				PO			
Biological Matrix	**P[f]**	**B**	**U**	**F**	**P[g]**	**B**	**U**	**F**	**P[h]**	**B**	**U**	**F**	**P[g]**	**B**	**U**	**F**	**P[f]**	**B**	**U**	**F**
ISL	61	NS	42.5	NA	X	0.2	22.3	NA	69/76	NS	30.2	NA	X	NA	34.3	2.7	58.0	NS	32.0	-
M1 (M4-Glucuronidation)	-	NS	-	NA	X	0.3	-	NA	-	NS	-	NA	-	NA	-	-	-	NS	-	-
M2 (M4-Glucuronidation)	-	NS	-	NA	-	0.7	-	NA	-	NS	-	NA	-	NA	-	-	-	NS	-	-
M3 (M4-Glucuronidation)	-	NS	-	NA	-	0.9	-	NA	-	NS	-	NA	-	NA	-	-	-	NS	-	-
M4 (Oxidative deamination)	21	NS	25.5	NA	X	0.1	43.1	NA	23/18	NS	25.3	NA	X	NA	5.2	28.3	31.0	NS	53.0	TA
M5 (M4-Glucuronidation)	-	NS	-	NA	-	0.5	-	NA	-	NS	-	NA	-	NA	-	-	-	NS	-	-
M6 (Direct glucuronidation)	-	NS	-	NA	-	2.6	-	NA	TA	NS	TA	NA	-	NA	4.8	-	-	NS	TA	-
M7 (Direct glucuronidation)	TA	NS	TA	NA	-	-	-	NA	TA	NS	TA	NA	-	NA	0.9	-	-	NS	TA	-
M8 (Direct glucuronidation)		NS	-	NA	-	-	-	NA	3/4	NS	1.2	NA	-	NA	-	-	-	NS	-	-
M9 (Oxidation)	-	NS	-	NA	-	-	-	NA	TA	NS	0.6	NA	-	NA	-	-	-	NS	-	-
Unidentified	11	NS	1.4	NA	-	-	-	NA	3/-	NS	1.8	NA	-	NA	-	-	<7	NS	0.9	-

C Confidential

2.6.5.12 In vivo における代謝（続き）

2.6.5.12.1 [^{3}H]又は[^{14}C]ISL 経口投与後の動物及びヒトの血漿中・排泄物中における ISL とその代謝物（続き）

Test Article: ISL

- =not detected; AUC=area under the concentration-time curve; B=bile; BDC=bile duct-cannulated; F=feces; h=hour(s); ISL=islatravir; LC=liquid chromatography; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; M=male; NS=not studied due to sample not collected; NA = not analyzed due to low recovery in this matrix; M=male; P=plasma; PO=oral(ly); TA=trace amount, detected by LC/MS but not observed in radiometric profile: U=urine; v/v=volume/volume; X=detected by either radiometric or LC-MS/MS analysis.

Note: Metabolite profiling in U was performed on pooled sample(s). For mouse, the single 0 to 24 h U sample was used without further pooling. For rabbit, 0 to 24 h U samples were pooled across subjects by combining an equal volume for each subject. For rat and monkey, 0 to 24 h U samples were pooled relative to the total volume excreted for each sample. For human, 0 to 96 h U samples were pooled relative to the total volume excreted for each sample from each subject and subsequently pooled across subjects and concentrated 2 to 3 fold prior to analysis. Rat B samples were pooled relative to the total volume of each sample from the 0 to 24 h collection interval. F samples were homogenized in deionized water for mouse, rat, rabbit, and monkey or in deionized water containing 10% methanol (v/v) for human, pooled proportionally across time and subjects to generate a single pooled sample for analysis. The 1 and 2 h mouse blood samples were taken via orbital bleed while the 6 and 24 h samples were taken via terminal blood collection (vena cava). Blood samples of rat, rabbit, monkey, and human were collected serially over the duration of the respective studies. Plasma was harvested by centrifugation and pooled either in an AUC-proportional manner or at selected time points across animals in the study. AUC-proportional pooled samples were prepared over 0 to 8 h for rat and monkey or over 0 to 24 h for mouse, rabbit, and human. Briefly, P samples were extracted by protein precipitation following the addition of organic solvent, centrifuged, and aliquots of the supernatants were analyzed.

[a] Values represent percentage of total integrated radioactivity relative to the administered dose (B, U, and F) unless otherwise indicated.

[b] Additional minor metabolites observed in radiochromatograms were not characterized due to the low abundance across matrices.

[c] P samples were obtained from intact rats following oral administration of [^{3}H]ISL at 5 mg/kg. An early eluting peak was also observed in the P radiochromatogram and was attributed to tritiated water.

[d] B, U, and F samples were obtained from BDC rats following PO administration of [^{3}H]ISL at 5 mg/kg.

[e] The recovery of radioactivity assigned to ISL and metabolites in B and U differs from the total radioactivity recovery determined in BDC rat study. This difference most likely occurs from retention of the radiolabel in the form of tritiated water in addition to lack of metabolite profiling in F.

[f] Values represent percentage relative to the total radioactivity in AUC-proportional pooled 0 to 24 h P.

[g] Amounts observed in P were not quantified relative to total radioactivity.

[h] Values for rabbit P represent percentage relative to total radioactivity in 1 h and AUC-proportional pooled 0 to 24 h P.

2.6.5.12　In vivo における代謝（続き）

2.6.5.12.2　ヒト血漿中における ISL 及び M4の半定量（P009試験 5 mg）

Test Article: ISL and ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.4.4: PK008]					
Species	Human					
Type of Study	Metabolite profiling in plasma					
Gender / Number of Subjects	M / 8 and F / 1					
Methods	Plasma samples, obtained on days 1, 28, and 42 from subjects administered 5 mg ISL oral dose once daily (P009), were pooled in an AUC-proportional manner from 0 to 24 h across subjects and analyzed.					
Biological samples:	Plasma					
Analytes	ISL and ISL metabolite M4					
Assay	LC-HRMS					
Biological Matrix	**Day 1**		**Day 28**		**Day 42**	
	Concentration (nM)	**%total[a]**	**Concentration (nM)**	**%total[a]**	**Concentration (nM)**	**%total[a]**
ISL	18	69	22	63	26	63
M4 (Oxidative deamination)	8	31	13	37	15	37

AUC=area under the concentration-time curve; F=female; h=hour(s); LC-HRMS=liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; M=male.

Note: Plasma samples were pooled from 0 to 24 h in an AUC-proportional manner across subjects. Pre-dose samples were pooled across subjects, with an equal volume, and used as the control. Each sample pool was then processed by protein precipitation and centrifuged. Aliquots of the supernatant were analyzed by LC-HRMS.

[a] %total=concentration of individual analyte / summed total concentration of analytes.

C Confidential

2.6.5.12　In vivo における代謝（続き）

2.6.5.12.3　マウス、ラット及びサルの慢性毒性試験における血漿中 M4の半定量

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.4.4: PK008] [4.2.2.4.3: PK028]	
Type of Study	Assessment of M4 in mouse, rat, and monkey plasma vs. human plasma	
Species / Strain	Mouse / CD-1 mice, Mouse / RasH2 wild-type mice, Rat / Wistar Hannover, Monkey / Rhesus	
Methods	Plasma samples from nonclinical toxicity studies conducted with oral dosing of ISL in mice, rats, and monkeys for at least 3 months duration were obtained and pooled in an AUC-proportional manner over a 24 h period for mice and rats and over a 72 h period for monkeys, at selected dose levels for each species, to evaluate the abundance of ISL metabolite M4 relative to its abundance in clinical samples.	
Analyte	ISL metabolite M4	
Assay	UPLC-HRMS	
Species	**ISL Dose**	**M4 (nM)**
Human (Study Day 42)	5 mg/day	15
Mouse (CD-1) TT#[redacted]-1020 (Study Day 90)	3.5 mg/kg/day	45
	10 mg/kg/day	92
	22 mg/kg/day	273
	45 mg/kg/day (NOAEL)	601
Mouse (RasH2 WT) TT#[redacted]-6002 (Study Day 86)	3.5 mg/kg/day	82
	10 mg/kg/day	251
	18 mg/kg/day (NOAEL)	411
	35 mg/kg/day	728
Rat TT#[redacted]-6011 (Study Day 64)	10 mg/kg/day (NOAEL)	577
Monkey TT#[redacted]-1068 (Study Day 85)	5 mg/kg/dose	34
	20 mg/kg/dose (NOAEL)	167

C Confidential

2.6.5.12　In vivo における代謝（続き）
2.6.5.12.3　マウス、ラット及びサルの慢性毒性試験における血漿中 M4 の半定量（続き）

Test Article: ISL Metabolite M4

AUC=area under the concentration-time curve; C_{pool}=concentration in pooled sample; h=hour(s); NOAEL=no observed adverse effect level; UPLC-HRMS=ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry; WT=wild type.

Note: Male and female CD-1 mouse plasma obtained on day 90 from the 3.5, 10, 22, and 45 mg/kg/day dose groups (TT #[redacted]-1020). Male and female rasH2 wild-type mouse plasma obtained on day 86 from the 3.5, 10, 18, and 35 mg/kg/day dose groups (TT#[redacted]-6002). Male and female Wistar Hanover rat plasma obtained on day 64 from the 10 mg/kg/day dose group at the NOAEL (TT#[redacted]-6011). Male and female Rhesus monkey plasma obtained on day 85 from the 5 and 20 mg/kg/day dose groups (TT#[redacted]-1068) were pooled proportionally to time so that the $AUC_{0\text{-}Xh}$ (where x=24 h for mouse and rat and 72 h for monkey) of M4 in the pooled sample was equal to $C_{pool} \times \Delta T$. Human plasma samples obtained from healthy volunteers in clinical protocol P009 following 42 days of daily dosing at 5 mg were pooled from 0 to 24 h in an AUC-proportional manner.

C Confidential

2.6.5.12　In vivo における代謝（続き）

2.6.5.12.4　ラット及びサルに単回経口投与した際の ISL の PBMC 中への取込み及び同化

Test Articles: ISL

Study Number		[4.2.2.4.5: PK005]				
Species / Strain		Rat / Wistar Han, Monkey / Rhesus				
Gender / Number of Animals		M / 12 (rat), M / 3 (monkey)				
Feeding Condition		Fed				
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 / suspension				
Method of Administration		PO				
Dose (mg /kg)		30 (rat), 50 (rhesus)				
Analytes		ISL, ISL MP, ISL DP, ISL TP				
Assay		LC-MS/MS				
Species	**Matrix**	**Analyte**	**$AUC_{0\text{-}72h}$ (h*µM)**	**C_{max} (µM)**	**T_{max} (h)**	**$t_{½}$ (h)**
Rat[a]	Plasma	ISL	20	3.0	2	10
	PBMC[c]	ISL	NC	66	2	NC
	PBMC[c]	ISL-MP	NC	NC	NC	NC
	PBMC[c,d]	ISL-DP	330	8.1	24	20
	PBMC[c,d]	ISL-TP	30	0.6	2	25
Monkey[b]	Plasma	ISL	128 ± 7.0	16.5 ± 5.2	1.3 ± 0.6	41 ± 6
	PBMC[c]	ISL	NC	5.9 ± 2.9	4 ± 0	NC
	PBMC[c]	ISL-MP	1600 ± 900	70 ± 27	4 ± 0	21 ± 15
	PBMC[c,d]	ISL-DP	11700 ± 3600	260 ± 30	11 ± 12	48 ± 4
	PBMC[c,d]	ISL-TP	850 ± 40	12 ± 1	17 ± 12	49 ± 8

C Confidential

2.6.5.12　In vivo における代謝（続き）
2.6.5.12.4　ラット及びサルに単回経口投与した際の ISL の PBMC 中への取込み及び同化（続き）

Test Article: ISL

AUC=area under the concentration-time curve; C_{max}=observed maximum concentration; DP=diphosphate; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; M=male; MP=monophosphate; n=number; NC=not calculated due to insufficient data; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; PO=oral(ly); $t_{½}$=terminal half-life; T_{max}=time to reach maximum concentration; TP=triphosphate.

[a] Represents mean values from terminal sampling (n=3).

[b] Represents mean ± standard deviation from sparse sampling (n=3).

[c] Concentrations in units of pmol/10^6 PBMC were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.

[d] Due to the insufficient stabilization of the PBMC samples, the likelihood that ISL-TP hydrolyzed to the more stable ISL-DP during sample storage and preparation for bioanalysis is high. Thus, levels of ISL-DP are likely overestimated while levels of ISL-TP are underestimated.

C Confidential

2.6.5.13　In vitro における代謝

2.6.5.13.1　In vitro における肝細胞での代謝

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002]		
Study System	In vitro		
Species/Matrix	Rat, Monkey, and Human cryopreserved hepatocytes		
Method	[^{3}H]ISL (5 µM) was incubated with 2 × 10^6 cells/mL hepatocytes in suspension at 37°C for 3 h in Williams E medium in the presence of humidified 95% air / 5% CO_2		
Analytes	[^{3}H]ISL and metabolites		
Assays	LC-MS/MS with on-line radiometric detection		
Metabolites Detected in Hepatocytes			
Metabolite	**Rat/ Wister Hannover**	**Monkey/ Rhesus**	**Human**
ISL	X	X	X
M6 (Direct glucuronidation)	X	X	ND
M7 (Direct glucuronidation)	ND	X	ND
LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ND=not detected; X=detected by either LC-MS/MS or radiometric detection.			
Note: The reactions were terminated by the addition of an equal volume of methanol containing 10 mM sodium fluoride and samples were centrifuged to remove precipitated protein and cell debris prior to analysis.			

C Confidential

2.6.5.13　In vitro における代謝（続き）

2.6.5.13.2　In vitro における腸管 S9での代謝

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002]		
Study System	In vitro		
Species / Matrix	Rat, Monkey, and Human / intestinal S9		
Method	[^{3}H]ISL (5 µM) was incubated with intestinal S9 at 37°C for 3 h		
Analyte	[^{3}H]ISL		
Assays	LC-MS/MS with radiometric detection		
Metabolites Detected in Intestinal S9			
Metabolite	**Rat / Sprague Dawley**	**Monkey / Cynomolgous**	**Human**
ISL	X	X	X
M4 (Oxidative deamination)	X	X	X

EDTA=ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA=ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N' tetra acetic acid; h=hour(s); LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; NADPH=reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; X=detected by either LC-MS/MS or radiometric detection.

Note: Incubations were conducted in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 1.0 mg/mL S9 protein, 5 mM MgCl2, and 1 mM NADPH (final volume of 0.5 mL). The reactions were terminated by the addition of 0.30 mL of a stop solution containing 6 mM EDTA + 6 mM EGTA in 70% methanol. Aliquots of the supernatant were analyzed following centrifugation to remove precipitated protein.

C Confidential

2.6.5.13　In vitro における代謝（続き）

2.6.5.13.3　In vitro における発現系ヒト ADA での代謝

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002]	
Study system	In vitro	
Matrix	Recombinant human adenosine deaminase	
Methods	ISL (50 µM) was incubated at 37°C for 3 h with recombinant human adenosine deaminase	
Analyte	ISL and metabolite M4	
Assays	LC-MS/MS	
Metabolites Detected in Incubations with and without Recombinant Human Adenosine Deaminase		
Metabolite	**Without Human Adenosine Deaminase**	**With Human Adenosine Deaminase**
ISL	X	X
M4 (Oxidative deamination)	ND	X
h=hour(s); HEPES=4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ND=not detected; X=detected by LC-MS/MS.		
Note: Incubations were conducted in 0.05 M HEPES buffer (pH 7.4) containing 1 unit/mL of recombinant human adenosine deaminase (a final volume of 0.25 mL). Reactions were terminated by the addition of an equal volume of acetonitrile. Aliquots of the supernatant were analyzed via LC-M/MS following centrifugation to remove precipitated protein.		

C Confidential

2.6.5.13　In vitro における代謝（続き）

2.6.5.13.4　In vitro におけるラット、サル及びヒト肝細胞での ISL の取込み及び同化

Test Articles: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002]				
Study System	In vitro				
Species	Rat, Monkey, Human				
Method	ISL (2 to 100 µM) was incubated for 2 h at 37°C with 2 × 10^6 hepatocytes/mL in William's E medium in the presence of humidified 95% air / 5% CO_2 (2.0 mL total volume)				
Analytes	ISL, ISL MP, ISL DP, ISL TP				
Assay	LC-MS/MS				
Species	**ISL incubation concentration (µM)**	**2**	**5**	**15**	**100**
	Analyte	**Analyte Concentration (µM)[b]**			
Rat	ISL	0.23	0.62	1.89	13.24
	ISL-MP[a]	BLQ	BLQ	0.14	0.34
	ISL-DP[a]	BLQ	BLQ	0.12	0.38
	ISL-TP[a]	BLQ	BLQ	BLQ	0.30
Monkey	ISL	0.25	0.60	1.70	9.62
	ISL-MP[a]	BLQ	0.56	1.15	2.63
	ISL-DP[a]	BLQ	BLQ	0.33	1.30
	ISL-TP[a]	BLQ	BLQ	0.37	1.10
Human	ISL	0.20	0.81	1.93	11.26
	ISL-MP[a]	BLQ	0.17	0.52	2.37
	ISL-DP[a]	BLQ	BLQ	0.16	1.02
	ISL-TP[a]	BLQ	BLQ	0.22	0.72

C Confidential

2.6.5.13　In vitro における代謝（続き）
2.6.5.13.4　In vitro におけるラット、サル及びヒト肝細胞での ISL の取込み及び同化（続き）

Test Articles: ISL

BLQ=below the lower limit of quantification; DP=diphosphate; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MP=monophosphate; RPMI=Roswell Park Memorial Institute Medium; TP=triphosphate.

Note: After incubation, cells were harvested by centrifugation, washed with William's E. medium, and harvested via centrifugation. The resulting cell pellet was re suspended in 0.25 mL of RPMI 1640 medium and immediately stabilized by the addition of 0.57 mL of methanol (70% final) and stored frozen at - 70°C until analysis via LC-MS/MS.

[a] Concentrations in units of pmol/10^6 hepatocytes were converted to µM using a cell volume of 3.4 pL per hepatocyte.

[b] BLQ≤0.12 µM for all analytes.

C Confidential

2.6.5.13 In vitro における代謝（続き）

2.6.5.13.5 In vitro におけるマウス新鮮血での PBMC 中への ISL の取込み及び同化

Test Articles: ISL

Study Number		[4.2.2.4.6: PK036]		
Study System		In vitro		
Species / Strain / Matrix		Mouse / CD-1 / blood		
Method		ISL (2-15 µM) was incubated in fresh mouse blood at 37°C for 2 h. After incubation, PBMCs were isolated and analyzed.		
Analytes		ISL, ISL-MP, ISL-DP, ISL-TP		
Assay		LC-MS/MS		
ISL Incubation Concentration (µM)		2.00	5.00	15.00
Species	**Analyte**	**Analyte Concentration (µM)**		
Mouse	ISL (extracellular)[a]	2.00	5.00	15.00
	ISL-MP[b]	1.37	3.14	4.66
	ISL-DP[b]	0.28	0.89	1.62
	ISL-TP[b]	1.79	3.84	5.39

DP=diphosphate; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MP=monophosphate; ND=not detected; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; RPMI=Roswell Park Memorial Institute Medium; TP=triphosphate; v/v=volume/volume.

Note: Following isolation, PBMCs were re-suspended in RPMI 1640 serum free medium and stabilized by the addition of methanol 70% (v/v final). The final cell suspension was stored frozen at - 70°C prior to analysis. The intracellular levels of ISL, ISL-MP, ISL-DP, and ISL-TP were measured via LC-MS/MS. Under these stabilization conditions, ISL-MP, ISL-DP, and ISL-TP are stable and do not hydrolyze after multiple freeze/thaw cycles.

[a] Extracellular concentrations were not measured but assumed to be equal to the concentration at the initiation of the experiment.

[b] Concentrations in units of pmol/10^6 PBMCs were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.

C Confidential

2.6.5.13　In vitro における代謝（続き）

2.6.5.13.6　In vitro におけるサル及びヒト新鮮血での PBMC 中への ISL の取込み及び同化：ISL リン酸化体の凍結融解に対する安定性評価

Test Articles: ISL

Study Number		[4.2.2.4.5: PK005]					
Study System		In vitro					
Species / Strain / Matrix		Monkey / Rhesus, Human / blood					
Method		ISL (2-15 µM) was incubated in fresh monkey or human blood at 37℃ for 2 h. After incubation, PBMCs were isolated and analyzed.					
Analytes		ISL, ISL MP, ISL DP, ISL TP					
Assay		LC-MS/MS					
ISL incubation concentration (µM)		2.0	2.0	5.0	5.0	15.0	15.0
Species	**Matrix (PBMC)**	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen	Fresh	Frozen
	Analyte	**Analyte Concentration (µM)**					
Monkey	ISL (extracellular)[a]	2.0	2.0	5.0	5.0	15.0	15.0
	ISL (intracellular)[b]	0.3	0.3	0.9	1.1	1.5	1.9
	ISL-MP[b]	4.6	6.2	10.1	11.9	12.4	17.1
	ISL-DP[b]	3.4	8.9	7.8	17.6	10.6	26.8
	ISL-TP[b]	6.5	1.3	15.6	2.7	18.1	3.8
Human	ISL (extracellular)[a]	2.0	2.0	5.0	5.0	15.0	15.0
	ISL (intracellular)[b]	ND	1.5	3.9	4.7	11.1	15.5
	ISL-MP[b]	33.5	48.9	76.5	111.6	227.6	306.5
	ISL-DP[b]	39.8	67.0	87.6	168.1	219.4	449.8
	ISL-TP[b]	83.0	45.1	180.9	98.0	440.5	229.4

C Confidential

2.6.5.13 In vitro における代謝（続き）

2.6.5.13.6 In vitro におけるサル及びヒト新鮮血での PBMC 中への ISL の取込み及び同化：ISL リン酸化体の凍結融解に対する安定性評価（続き）

Test Articles: ISL

DP=diphosphate; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MP=monophosphate; ND=not detected; PBMC=peripheral blood mononuclear cell; RPMI=Roswell Park Memorial Institute Medium; TP=triphosphate; v/v=volume/volume.

Note: Following isolation, PBMCs were re-suspended in RPMI 1640 serum free medium. The final cell suspension was divided into two aliquots where one aliquot was analyzed immediately while the second aliquot was stored frozen at - 70°C prior to analysis. The intracellular levels of ISL, ISL-MP, ISL-DP, and ISL-TP were measured via LC-MS/MS. Stabilization of intracellular ISL-MP, ISL-DP, and ISL-TP in PBMCs was achieved by the addition of methanol (70% v/v final) to the PBMC suspensions prior to freezing. Under these stabilization conditions, ISL-MP, ISL-DP, and ISL-TP are stable and do not hydrolyze after multiple freeze/thaw cycles.

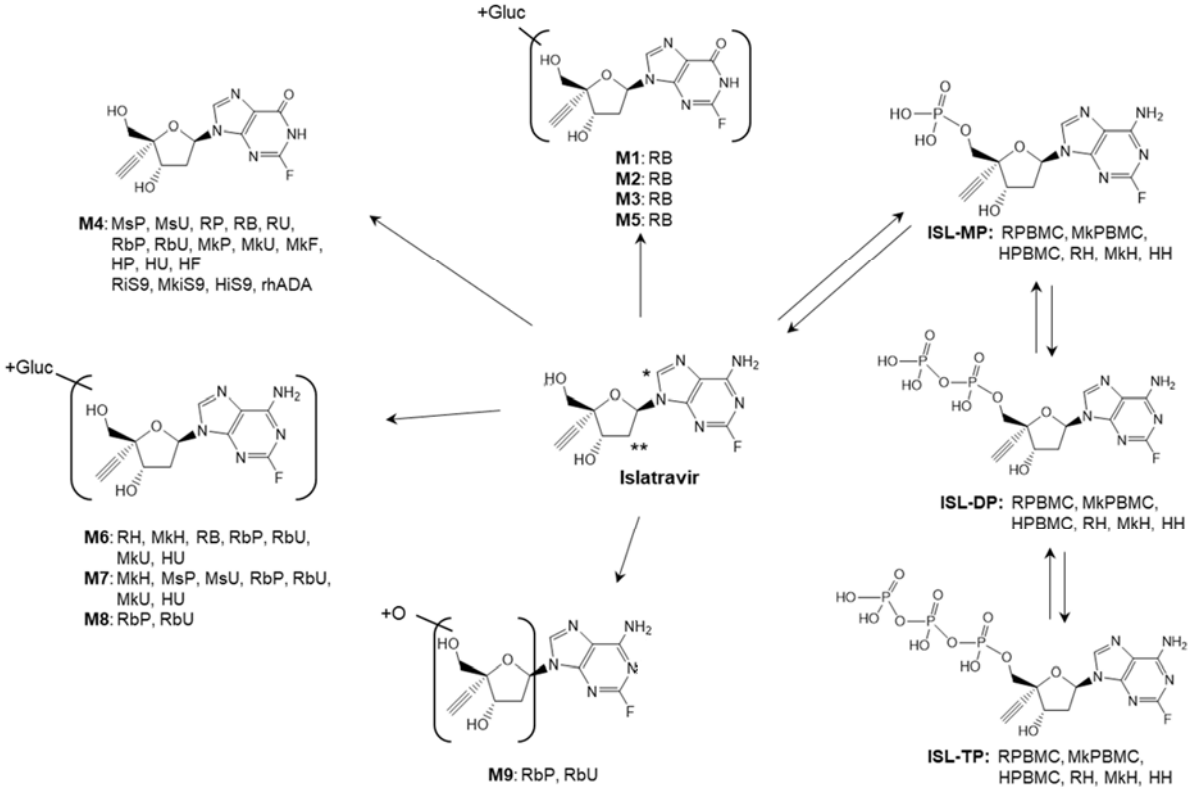
[a] Extracellular concentrations were not measured but assumed to be equal to the concentration at the initiation of the experiment.

[b] Concentrations in units of pmol/10^6 PBMCs were converted to µM using a cell volume of 0.200 pL per PBMC.

C Confidential

2.6.5.14 In vitro 及び in vivo における推定代謝経路

Test Article: ISL
Study Numbers: [4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.4.2: PK003] [4.2.2.4.5: PK005] [4.2.2.4.4: PK008] [4.2.2.4.1: PK027] [5.3.3.1.5: P025]



DP=diphosphate; Gluc=glucuronide; HF=human feces; HH=human hepatocytes; HiS9=human intestinal S9; HP=human plasma; HPBMC=human peripheral blood mononuclear cell; HU=human urine; MkH=monkey hepatocytes; MkF=monkey feces; MkiS9=monkey intestinal S9; MkP=monkey plasma; MkPBMC=monkey peripheral blood mononuclear cell; MkU=monkey urine; MP=monophosphate; MsP=mouse plasma; MsU=mouse urine; RB=rat bile; RbP=rabbit plasma; RbU=rabbit urine; RH=rat hepatocytes; rhADA=recombinant human adenosine deaminase; RiS9=rat intestinal S9; RP=rat plasma; RPBMC=rat peripheral blood mononuclear cell; RU=rat urine; TP=triphosphate.

Note: *Indicates the position of ^{3}H and ** indicates the position of ^{14}C.

C Confidential

2.6.5.15 動物における排泄

2.6.5.15.1 動物に単回静脈内投与した際の ISL の腎排泄

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.2.2: PK001] [4.2.2.2.1: PK024]						
Type of Study	Renal excretion of ISL in animals following IV administration						
Methods	LC-MS/MS						
Analyte	ISL						
Assay Conditions	Urine was collected from each animal for the duration of the study (0 to X h)						
Species	**Dose (mg/kg)**	**CL_p (mL/min/kg)**	**$AUC_{(0\text{-}Xh)}$[a] (h*µM)**	**Unchanged ISL in 0 to Xh[a] Urine (µmol)**	**CL_r (mL/min)**	**CL_r[b] (mL/min/kg)**	**% Excreted in Urine[c]**
Mouse[d]	1	25.2	2.2	0.068	0.51	15.4	61
Rat[e]	1	65.0[f]	0.87	0.16	3.3	11.5	18
Rabbit[g]	1	17.2 ± 4.9	3.5 ± 0.8	2.05 ± 0.74	10.2 ± 3.6	5.3 ± 1.7	31
Monkey[g]	1	17.1 ± 33	3.3 ± 0.7	13.6 ± 3.3	70.7 ± 20.5	8.7 ± 2.2	51

AUC=area under the concentration-time curve; CL_p=plasma clearance; CL_r=renal clearance; h=hour(s); ISL=islatravir; IV=intravenous(ly); LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; n=number.

[a] X=24 h for mouse, rat, and monkey, and 48 h for rabbit.

[b] Calculated using the mean body weight for mouse, rat, and monkey and the individual body weight of each subject for rabbit.

[c] Percent excreted in urine=CLr/CLp × 100.

[d] Data in mouse represents mean values from sparse sampling n=3 subjects.

[e] Data in rat represents the composite values from sparse sampling in n=6 subjects.

[f] CLp from the composite analysis is in good agreement with the CLp reported in the pharmacokinetic study.

[g] Data represent mean ± standard deviation (n=3).

C Confidential

2.6.5.15　動物における排泄（続き）

2.6.5.15.2　マウスとウサギに[^{14}C]ISL を単回経口投与した際の総放射能の排泄

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.4.1: PK027]	[4.2.2.4.1: PK027]
Species / Strain		Mouse / CD-1 (intact)	Rabbit / Dutch Belted (intact)
Gender / Number of Animals		M / 3	F / 2
Feeding Condition		Fasted	Fasted
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 / solution	10% Tween 80 / solution
Method of Administration		PO	PO
Dose (mg/kg)		5	5
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)		[^{14}C]ISL / 173.6	[^{14}C]ISL / 173.6
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg		49.0	19.9
Analyte / Assay		Total radioactivity / LSC	Total radioactivity / LSC
Matrix	**Collection Time (h)**	**% of Dose Recovered[a]**	
		Mouse[b]	**Rabbit[c]**
Urine	0 to 2	68.9	57.1
	24 to 48	1.7	2.5
	48 to 72	0.3	0.8
	Sub-total	**70.9**	**60.3**
Feces	0 to 24	4.6	2.9
	24 to 48	0.3	2.2
	48 to 72	0.0	1.2
	Sub-total	**4.9**	**6.2**

C Confidential

2.6.5.15　動物における排泄（続き）
2.6.5.15.2　マウスとウサギに[^{14}C]ISL を単回経口投与した際の総放射能の排泄（続き）

Test Article: ISL

Matrix	Collection Time (h)	% of Dose Recovered[a]	
		Mouse[b]	Rabbit[c]
Cage Wash	0 to 24	2.1	5.7
	24 to 48	0.5	0.3
	48 to 72	0.1	0.2
	Sub-total	**2.7**	**6.1**
Total		**78.5**	**72.6**

F=female; h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; PO=oral(ly).

[a] Values represent mean percentage of recovered dose relative to the administered dose.

[b] For the mouse study, three animals were dosed and animals were housed in one metabolism cage generating single samples of excreta and cage wash per collection interval.

[c] For the rabbit study, three animals were dosed but one was excluded from the analysis due to issues encountered with excreta collection, where a significant fraction of the dose was recovered in the cage wash of one subject.

C Confidential

2.6.5.15 動物における排泄（続き）

2.6.5.15.3 ラットに[^{3}H]ISL を単回経口投与した際の総放射能の排泄

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.4.2: PK003]
Species / Strain		Rat / Wistar Han (BDC)
Gender / Number of Animals		M / 3
Feeding Condition		Fasted
Vehicle / Formulation		10% Tween / solution
Method of Administration		PO
Dose (mg/kg)		5
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)		[^{3}H]ISL / 2464
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		72.5
Analyte/Assay		Total radioactivity / LSC
Matrix	**Collection Time (h)**	**% of Dose Recovered[a]**
Bile	0 to 4	4.1 ± 1.7
	4 to 8	3.1 ± 1.2
	8 to 24	0.5 ± 0.2
	24 to 48	0.3 ± 0.1
	48 to 72	0.2 ± 0.1
	Sub-total	**8.3 ± 3.3**
Urine	0 to 8	54.2 ± 18.0
	8 to 24	15.6 ± 7.1
	24 to 48	2.3 ± 1.1
	48 to 72	1.6 ± 1.3
	Sub-total	**73.7 ± 15.9**
Feces	0 to 24	3.9 ± 0.9
	24 to 48	0.6 ± 0.4
	48 to 72	0.2 ± 0.1
	Sub-total	**4.7 ± 1.0**
Cage Wash	0 to 72	2.8 ± 2.9
Cage Wipes	0 to 72	1.5 ± 1.4
	Sub-total	**4.4 ± 4.4**
Total		**91.1 ± 10.0**

BDC=bile duct-cannulated; h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; n=number; PO=oral(l).

[a] Values represent mean percentage ± standard deviation (n=3) of recovered dose relative to the administered dose.

2.6.5.15 動物における排泄（続き）

2.6.5.15.4 サルに[^{3}H]ISL を単回経口投与した際の総放射能の排泄

Test Article: ISL

Study Number		[4.2.2.4.2: PK003]
Species / Strain		Monkey / Rhesus (BDC)
Gender / Number of Animals		M / 3
Feeding Condition		Fasted
Vehicle / Formulation		10% Tween 80 / solution
Method of Administration		PO
Dose (mg/kg)		5
Radionuclide / Specific Activity (µCi/mg)		[^{3}H]ISL / 2464
Specific Activity of Dosing Solution (µCi/mg)		1.4
Analyte / Assay		Total radioactivity / LSC
Matrix	**Collection Time (h)**	**% of Dose Recovered[a]**
Bile	0 to 8	1.3 ± 1.4
	8 to 24	1.7 ± 1.3
	24 to 30	0.2 ± 0.2
	30 to 48	0.2 ± 0.2
	48 to 54	0.1 ± 0.0
	54 to 72	0.1 ± 0.1
	Sub-total	**3.6 ± 1.7**
Urine	0 to 8	25.0 ± 13.6
	8 to 24	12.4 ± 6.6
	24 to 48	4.0 ± 0.9
	48 to 72	2.5 ± 0.5
	72 to 96	1.5 ± 0.2
	96 to 120	1.3 ± 0.2
	Sub-total	**46.6 ± 8.7**
Feces	0 to 24	17.0 ± 4.3
	24 to 48	11.8 ± 4.9
	48 to 72	1.3 ± 1.0
	72 to 96	0.8 ± 1.0
	96 to 120	0.1 ± 0.1
	Sub-total	**31.0 ± 8.3**
Cage Wash	0 to 120	**1.2 ± 0.3**
Total		**82.4 ± 2.4**

BDC=bile duct-cannulated; h=hour(s); ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; M=male; n=number; PO=oral(l).

[a] Values represent mean percentage ± standard deviation (n=3) of recovered dose relative to the administered dose.

C Confidential

2.6.5.15 動物における排泄（続き）

2.6.5.15.5 動物に単回静脈内投与した際の M4の腎排泄

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.2.3: PK025]						
Type of Study	Renal excretion of metabolite M4 in animals following IV administration						
Methods	LC-MS/MS						
Analyte	M4						
Assay Conditions	Urine was collected from each animal for the duration of the study (0 to X h)						
Species	**Dose (mg/kg)**	**CL_p (mL/min/kg)**	**$AUC_{(0-Xh)}$[a] (h*µM)**	**Unchanged M4 in 0 to X h[a] Urine (µmol)**	**CL_r (mL/min)**	**CL_r[b] (mL/min/kg)**	**% Excreted in Urine[c]**
Mouse[d]	1	38.7	1.5	0.059	0.67	20.4	53
Rat[e]	1	27.7 ± 1.3	2.0 ± 0.1	0.76 ± 0.11	6.2 ± 0.9	21.3 ± 3.1	77
Rabbit[e]	1	33.5 ± 8.4	1.8 ± 0.5	4.22 ± 2.13	39.9 ± 16.4	21.1 ± 9.1	63
Monkey[e]	1	12.0 ± 4.8	5.4 ± 2.6	14.1 ± 5.6	44.6 ± 7.7	6.5 ± 1.9	54

AUC=area under the concentration-time curve; CL_p=plasma clearance; CL_r=renal clearance; h=hour(s); IV=intravenous(ly); LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; n=number.

[a] X=24 h for mouse and rat, and 48 h for rabbit and monkey.

[b] Calculated using the mean body weight for mouse and the individual body weight of each subject for rat, rabbit, and monkey.

[c] Percent excreted in urine=$CL_r/CL_p \times 100$.

[d] Data in mouse represents mean values from n=3 subjects.

[e] For the mouse study, three animals were dosed and animals were housed in one metabolism cage generating single samples of excreta and cage wash per collection interval.

C Confidential

2.6.5.16 ISL の消失に関与する酵素

2.6.5.16.1 ISL の M4への酸化的脱アミノ化に関与する ADA の速度論的パラメータ

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.1: PK029]		
Type of Study	Enzyme kinetics		
Methods	Increasing concentrations of ISL (1 to 250 µM) were incubated in rhADA preparations at 37°C monitoring the formation of ISL metabolite M4		
Analyte	ISL metabolite M4		
Assay	LC-MS/MS		
Assay Conditions			
Enzyme	**Final ISL Concentation (µM)**	**rhADA Concentration (µg/mL)**	**Incubation Time (min)**
rhADA	1, 2 ,4, 8, 16, 32, 64, 125, 250	5	15
Kinetic Parameters[a]			
K_m	>250 µM		
V_{max}	ND		

ISL=islatravir; K_m=Michaelis constant; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); ND=not determined; rhADA=recombinant human adenosine deaminase; V_{max}=maximal rate.

Note: Increasing concentrations of ISL were incubated with rhADA (5 µg/mL) at 37°C in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 2 mM $MgCl_2$ for 15 min. Reactions were terminated by the addition of organic solvent containing internal standard. The resulting supernatants were then analyzed by LC-MS/MS.

[a] The rate of M4 formation was linear over the 1 to 250 µM concentration range tested and did not exhibit saturation of this reaction. As a result, non-linear regression analysis to determine the kinetic constants K_m and V_{max} could not be performed.

C Confidential

2.6.5.17　ISL の同化に関与する酵素

2.6.5.17.1　ISL の ISL-MP へのーリン酸化に関与する dCK の速度論的パラメータ

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.2: PK037]		
Type of Study	Enzyme kinetics		
Methods	Increasing concentrations of ISL (5 to 300 µM) were incubated in rhdCK preparations at 37°C monitoring the formation of ISL-monophosphate		
Analyte	ISL-monophosphate		
Assay	LC-MS/MS		
Assay Conditions			
Enzyme	**Final ISL Concentation (µM)**	**rhdCK Concentration (µg/mL)**	**Incubation Time (min)**
rhdCK	5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 250, 300	0.5	15
Kinetic Parameters[a]			
K_m	106 ± 11 µM[a]		
V_{max}	0.47 ± 0.02 nmol/min/µg[a]		
V_{max}/K_m	0.0044 mL/min/µg		

ATP=adenosine triphosphate; ISL=islatravir; K_m=Michaelis constant; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); rhdCK=recombinant human adenosine deaminase; SE=standard error; V_{max}=maximal rate.

Note: Increasing concentrations of ISL were incubated with rhdCK (0.5 µg/mL) at 37°C in 0.1 M Tris buffer (pH 7.4) containing 50 mM KCl, and 5 mM $MgCl_2$ for 15 min in the presence of 1 mM ATP. Reactions were terminated by the addition of organic solvent containing internal standard. The resulting supernatants were then analyzed by LC-MS/MS.

[a] Data represent mean ± SE of n=3 replicates.

Confidential

2.6.5.17　ISL の同化に関与する酵素（続き）
2.6.5.17.2　3TC 及び FTC のーリン酸化に関与する dCK の速度論的パラメータ

Test Article: 3TC, FTC

Study Number	[4.2.2.6.3: PK0011000773285]		
Type of Study	Enzyme kinetics		
Methods	Increasing concentrations of 3TC or FTC (0.25 to 100 µM) were incubated in rhdCK preparations at 37°C monitoring the formation of either 3TC-monophosphate or FTC-monophosphate		
Analyte	3TC-monophosphate; FTC-monophosphate		
Assay	LC-MS/MS		
Assay Conditions			
Enzyme	**Final Substrate Concentation (µM)**	**rhdCK Concentration (µg/mL)**	**Incubation Time (min)**
rhdCK	0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 70, 100	2.0	10

Kinetic Parameters[a]

Substrate	**3TC**	**FTC**
K_m (µM)	3.2 ± 0.2	2.4 ± 0.3
V_{max} (nmol/min/µg)	0.0071 ± 0.00008	0.015 ± 0.0004
V_{max}/K_m (mL/min/µg)	0.0022	0.0063

3TC=lamivudine; ATP=adenosine triphosphate; FTC=emtricitabine; K_m=Michaelis constant; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); rhdCK=recombinant human adenosine deaminase; SE=standard error; V_{max}=maximal rate.

Note: Increasing concentrations of 3TC or FTC were incubated with rhdCK (2.0 µg/mL) at 37°C in 0.1 M Tris buffer (pH 7.4) containing 50 mM KCl, and 5 mM $MgCl_2$ for 10 min in the presence of 1 mM ATP. Reactions were terminated by the addition of organic solvent containing internal standard. The resulting supernatants were then analyzed by LC-MS/MS.

[a] Data represent mean ± SE of n=3 replicates.

Confidential

2.6.5.17　ISL の同化に関与する酵素（続き）

2.6.5.17.3　3TC、FTC 及びエンテカビルによるーリン酸化の阻害

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.2: PK037]
Type of Study	In vitro inhibition of rhdCK
Methods	In vitro incubation of ISL with rhdCK in the presence of 3TC (0.1 to 150 µM), FTC (0.1 to 150 µM), or entecavir (0.1 to 200 µM)
Analyte	ISL-monophosphate
Assay	LC-MS/MS

Inhibitor	**IC_{50} (µM)**
3TC	4.4
FTC	2.5
Entecavir	>200

3TC=lamivudine; ATP=adenosine triphosphate; FTC=emtricitabine; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); min=minute(s); rhdCK=recombinant human adenosine deaminase; SE=standard error.

Note: ISL (100 µM) was incubated with rhdCK (0.5 µg/mL) at 37°C in 0.1 M Tris buffer (pH 7.4) containing 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, and 1 mM ATP in the presence increasing concentration of either 3TC, FTC, or entecavir for 15 min. Reactions were terminated by the addition of organic solvent containing internal standard. The resulting supernatants were then analyzed by LC-MS/MS.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価

2.6.5.18.1 LLC-PK1細胞における ISL のヒト P-gp に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.4: PK004]			
Type of Study	Transporter phenotyping			
Methods	Bi-directional transport of ISL across LLC-PK1 cell monolayers stably expressing MDR1			
Analytes	ISL, Verapamil			
Assay	LC-MS/MS			
Compound	**Concentration (µM)**	**Human LLC-MDR1 B-A/A-B Ratio[a,b]**	**LLC-PK1 B-A/A-B Ratio[a,b]**	**LLC-PK1 P_{app} (× 10^{-6} cm/s)[a,c]**
Verapamil	1	4.1	1.0	32.4
ISL	0.1	0.9	1.6	3.6
	1.0	1.2	1.6	3.2

A-B=apical-basolateral; B-A=basolateral-apical; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLC-PK1=Lilly Laboratories cell porcine kidney epithelial 1; MDR1=multidrug resistance protein 1; n=number; P_{app}=apparent permeability.

Note: Bi-directional transport of ISL (0.1 and 1 µM) was measured across monolayers LLC-PK1 and LLC-MDR1 cells at 37°C. Bi-directional transport of verapamil (1 µM) was measured in parallel as a positive control.

Note: Due to the low passive permeability of ISL (P_{app} 3.2 to 3.6 × 10^{-6} cm/s), it could not reliably be determined whether ISL was a substrate of human P-glycoprotein.

[a] Values represent the mean of n=3.

[b] The B-A/A-B ratio was calculated by dividing the P_{app} from B to A by the P_{app} from A to B.

[c] The P_{app} reported is the average of the P_{app} for transport from A to B and P_{app} for transport from B to A values.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.2　Sf9細胞の膜小胞における ISL のヒト P-gp に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.5: PK019]						
Type of Study	Transporter phenotyping						
Methods	Uptake of ISL into Sf9 membrane vesicles containing human MDR1 P-gp						
Analytes	[^{3}H]N-methyl-quinidine, [^{14}C]ISL						
Assay	LSC						
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**Control vesicles**		**MDR1 P-gp vesicles**		
			AMP[a,b]	**ATP[b]**	**AMP[a,b]**	**ATP[b]**	**Fold difference between ATP and AMP[c]**
			(pmol/mg protein)	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	
[^{3}H]N-methyl-quinidine	-	10	5.76 ± 0.22	12.77 ± 0.74	5.88 ± 0.05	155.00 ± 10.56	26.4
	Cyclosporin A	10	5.99 ± 0.42	10.19 ± 1.87	7.69 ± 0.66	18.79 ± 1.88	NA
[^{14}C]ISL	-	0	3.28 ± 0.27	4.39 ± 0.46	3.98 ± 2.36	3.98 ± 0.66	1.0
		1	3.04 ± 0.20	3.98 ± 0.27	3.39 ± 0.27	3.80 ± 0.81	1.1
		2	3.80 ± 0.71	3.69[d]	2.75 ± 0.66	3.63 ± 0.90	1.3
		5	4.39 ± 0.61	4.86 ± 0.90	4.74 ± 2.02	3.10 ± 0.27	0.7
		10	3.51 ± 0.18	5.74 ± 2.11	4.68 ± 0.44	3.69 ± 1.33	0.8
	Cyclosporin A	10	3.96 ± 0.82	5.04 ± 0.82	3.24 ± 0.62	4.62 ± 0.55	NA

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.2　Sf9 細胞の膜小胞における ISL のヒト P-gp に対する基質認識性の評価（続き）

Test Article: ISL

- =no inhibitor; AMP=adenosine monophosphate; ATP=adenosine triphosphate; ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; MDR1=multidrug resistance protein 1; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; P-gp=P-glycoprotein; Sf9=spodoptera frugiperda.

Note: Time- and ATP-dependent uptake of [^{14}C]ISL (5 µM) into Sf9 membrane vesicles containing human MDR1 P-gp or control vesicles was measured. [^{3}H]N-methyl-quinidine (0.5 µM) was used as a positive control substrate and cyclosporin A (10 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDR1 P-gp or control vesicles (with AMP or ATP), followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold stop buffer, and reaction mixtures were transferred to a glass fiber filter plate under vacuum and washed five times with ice-cold stop buffer. The radioactivity in the dried filters was determined by LSC.

[a] AMP (12.5 mM) used as negative control in the presence of an ATP-regenerating system.

[b] Values represent mean ± standard deviation (n=3) unless otherwise indicated.

[c] Fold difference is calculated by dividing the ATP-dependent uptake by the AMP-dependent uptake in MDR1 P-gp vesicles. Fold of uptake is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control vesicles.

[d] Mean of n=2 replicates.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.3 MDCKII 細胞における ISL のヒト BCRP に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.5: PK019]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Bi-directional transport of ISL across MDCKII cell monolayers stably expressing BCRP				
Analytes	ISL, Prazosin				
Assay	LC-MS/MS				
Compound	**Concentration (µM)**	**Inhibitor**	**MDCKII-BCRP B-A/A-B Ratio[a]**	**MDCKII B-A/A-B Ratio[a]**	**MDCKII P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)[a,b]**
Prazosin	1.0	-	14.9	1.0[c]	31.1[c]
		Ko143	0.8	0.7	
ISL	0.5	-	2.2	0.9	2.0
		Ko143	0.3[d]	0.7[c]	
	1.0	-	1.7	0.9	2.2
		Ko143	0.3	0.7	
	2.0	-	4.3	0.8	1.6
		Ko143	0.9	0.9	

- =no inhibitor; A-B=apical-basolateral; B-A=basolateral-apical; BCRP=breast cancer resistance protein; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-BCRP=MDCKII cells stably expressing human BCRP; n=number; P_{app}=apparent permeability.

Note: Bi-directional transport of ISL (0.5 to 2 µM) was measured across monolayers MDCKII and MDCKII-BCRP cells at 37°C, in the absence and presence of the BCRP inhibitor Ko143 (5 µM). Bi-directional transport of prazosin (1 µM) was measured in parallel as a positive control.

[a] Values represent mean of n=3 unless otherwise indicated.

[b] The P_{app} reported is the average of the P_{app} for transport from A to B and P_{app} for transport from B to A values. The B-A/A-B ratio was calculated by dividing the P_{app} from B to A by the P_{app} from A to B.

[c] Mean of n=2.

[d] Data from n=1.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.4 MDCKII 細胞における ISL のヒト OAT1に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.4: PK004]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{3}H]ISL into MDCKII cells stably expressing OAT1				
Analytes	[^{3}H]*p*-Aminohippuric acid; [^{3}H]ISL				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-OAT1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]*p*-Aminohippuric acid	-	5	0.125 ± 0.007	20.190 ± 0.434	161.1
	Probenecid	5	0.717 ± 0.014	0.640 ± 0.012	NA
[^{3}H]ISL	-	0	0.199 ± 0.015	0.165 ± 0.003	0.8
	-	1	0.337 ± 0.014	0.344 ± 0.013	1.0
	-	3	0.583 ± 0.013	0.535 ± 0.023	0.9
	-	5	0.694 ± 0.039	0.722 ± 0.021	1.0
	Probenecid	5	0.187 ± 0.018	0.434 ± 0.025	NA

- =no inhibitor; ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-OAT1=MDCKII cells stably expressing human OAT1; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; OAT1=organic anion transporter 1; PBS=phosphate buffered saline.

Note: Uptake of [^{3}H]ISL (1 µM) into MDCKII and MDCKII-OAT1 cells was measured. [^{3}H]*p*-Aminohippuric acid (1 µM) was used as a positive control substrate and probenecid (1 mM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-OAT1 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold PBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with PBS. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard error of the mean (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.5 MDCKII 細胞における ISL のヒト OAT3に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.4: PK004]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{3}H]ISL into MDCKII cells stably expressing OAT3				
Analytes	[^{3}H]Estrone sulfate; [^{3}H]ISL				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-OAT3 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]Estrone sulfate	-	5	0.252 ± 0.014	6.391 ± 0.451	25.3
	Probenecid	5	0.391 ± 0.021	0.368 ± 0.016	NA
[^{3}H]ISL	-	0	0.199 ± 0.015	0.188 ± 0.010	0.9
	-	1	0.337 ± 0.014	0.434 ± 0.024	1.3
	-	3	0.583 ± 0.013	0.660 ± 0.043	1.1
	-	5	0.694 ± 0.039	0.853 ± 0.034	1.2
	Probenecid	5	0.187 ± 0.018	0.125 ± 0.011	NA

- =no inhibitor; ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; min=minute(s); MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-OAT3=MDCKII cells stably expressing human OAT3; n=number; NA=not applicable; OAT3=organic anion transporter 3; PBS=phosphate buffered saline.

Note: Uptake of [^{3}H]ISL (1 µM) into MDCKII and MDCKII-OAT3 cells was measured. [^{3}H]Estrone sulfate (1 µM) was used as a positive control substrate and probenecid (1 mM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-OAT3 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold PBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with PBS. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard error of the mean (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.6 CHO-K1細胞における ISL のヒト OCT2に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.4: PK004]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{3}H]ISL into CHO-K1 cells stably expressing OCT2				
Analytes	[^{14}C]Tetraethylammonium; [^{3}H]ISL				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**CHO-K1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**CHO-K1-OCT2 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{14}C]Tetraethylammonium	-	10	0.553 ± 0.028	3.436 ± 0.355	6.2
	Quinidine	10	0.405 ± 0.033	0.872 ± 0.080	NA
[^{3}H]ISL	-	0	0.400 ± 0.012	0.327 ± 0.046	0.8
	-	1	0.651 ± 0.034	0.547 ± 0.025	0.8
	-	3	0.979 ± 0.024	0.716 ± 0.078	0.7
	-	5	0.965 ± 0.061	0.786 ± 0.082	0.8
	Quinidine	5	1.124 ± 0.035	0.813 ± 0.122	NA

- =no inhibitor; CHO-K1=Chinese hamster ovary-K1; CHO-K1-OCT2=CHO-K1 cells stably expressing OCT2; ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; OCT2=organic cation transporter 2; PBS=phosphate buffered saline.

Note: Uptake of [^{3}H]ISL (1 µM) into CHO-K1 and CHO-K1-OCT2 cells was measured. [^{14}C]Tetraethylammonium (1 µM) was used as a positive control substrate and quinidine (100 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to CHO-K1 and CHO-K1-OCT2 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold PBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with PBS. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard error of the mean (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.7　CHO-K1細胞における ISL のヒト MATE1に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.5: PK019]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL into CHO-K1 cells stably expressing MATE1				
Analytes	[^{14}C]Metformin; [^{14}C]ISL				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**CHO-K1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**CHO-K1-MATE1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{14}C]Metformin	-	10	0.69 ± 0.11	18.74 ± 0.39	27.0
	Pyrimethamine	10	0.68 ± 0.18	0.62 ± 0.03	NA
[^{14}C]ISL	-	0	1.13 ± 0.06	1.18 ± 0.12	1.1
	-	5	1.56 ± 0.09	1.56 ± 0.10	1.0
	-	10	2.11 ± 0.33	2.14[c] ± 0.12	1.0
	-	15	2.40 ± 0.16	2.72 ± 0.11	1.1
	-	20	2.90 ± 0.27	2.94 ± 0.20	1.0
	Pyrimethamine	20	2.52 ± 0.22	2.82 ± 0.15	NA

- =no inhibitor; CHO-K1=Chinese hamster ovary-K1; CHO-K1-MATE1=CHO-K1 cells stably expressing MATE1; DPBS=Dulbecco's phosphate buffered saline; ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; min=minute(s); n=number; NA=not applicable.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (2 µM) into CHO-K1 and CHO-K1-MATE1 cells was measured. [^{14}C]Metformin (5 µM) was used as a positive control substrate and pyrimethamine (5 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to CHO-K1 and CHO-K1-MATE1 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold DPBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with DPBS. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3) unless otherwise indicated.

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

[c] Values represent mean of n=2.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.8　MDCKII 細胞における ISL のヒト MATE2K に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.5: PK019]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL in MDCKII cells stably expressing MATE2K				
Analytes	[^{14}C]Metformin; [^{14}C]ISL				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-MATE2K[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{14}C]Metformin	-	10	0.98 ± 0.05	20.72 ± 0.89	21.2
	Pyrimethamine	10	0.95 ± 0.16	1.74 ± 0.13	NA
[^{14}C]ISL	-	0	0.41 ± 0.06	0.78 ± 0.05	1.9
	-	5	2.01 ± 0.09	2.09 ± 0.21	1.0
	-	10	2.51 ± 0.18	2.70 ± 0.19	1.1
	-	15	2.71 ± 0.22	3.21 ± 0.13	1.2
	-	20	3.12 ± 0.17	3.56 ± 0.17	1.1
	Pyrimethamine	20	2.77 ± 0.22	4.85 ± 0.20	NA

- =no inhibitor; DPBS=Dulbecco's phosphate buffered saline; ISL=islatravir; LSC=liquid scintillation counting; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-MATE2K=MDCKII cells stably expressing MATE2K; min=minute(s); n=number; NA=not applicable.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (2 µM) into MDCKII and MDCKII-MATE2K cells was measured. [^{14}C]Metformin (5 µM) was used as a positive control substrate and pyrimethamine (5 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-MATE2K cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold DPBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with DPBS. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.9　MDCKII 細胞における ISL のヒト CNT1に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.9: PK031]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL into MDCKII cells stably expressing CNT1				
Analytes	[^{14}C]ISL, [^{3}H]Uridine				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-CNT1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]Uridine	-	5	0.089 ± 0.014	67.619 ± 1.655	757.0
	Gemcitabine	5	0.095 ± 0.013	11.263 ± 0.912	NA
[^{14}C]ISL	-	0	0.357 ± 0.061	0.554 ± 0.066	1.6
	-	1	0.688 ± 0.116	1.216 ± 0.090	1.8
	-	3	1.000 ± 0.340	2.210 ± 0.127	2.2
	-	5	1.337 ± 0.156	2.739 ± 0.072	2.0
	Gemcitabine	5	1.133± 0.201	2.018 ± 0.158	NA

- =no inhibitor; CNT=concentrative nucleoside transporter; ENT=equilibrative nucleoside transporter; ISL=islatravir; KHB=Krebs Henseleit Buffer; LSC=liquid scintillation counting; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-CNT1=MDCKII cells stably expressing human CNT1; min=minute(s); N=number; NA=not applicable; NBMPR=S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (2 µM) into MDCKII cells and MDCKII-CNT1 cells was measured. [^{3}H]Uridine (1 µM) was used as a positive control substrate and gemcitabine (300 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-CNT1 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold sodium-free KHB with NBMPR (to inhibit endogenous ENT transport) and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with sodium-free KHB with NBMPR. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.10 MDCKII 細胞における ISL のヒト CTN2に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.9: PK031]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL into MDCKII cells stably expressing CNT2				
Analytes	[^{14}C]ISL, [^{3}H]Uridine				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-CNT2 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]Uridine	-	5	0.142 ± 0.030	0.874 ± 0.074	6.1
	Adenosine	5	0.128 ± 0.025	0.187 ± 0.011	NA
[^{14}C]ISL	-	0	0.375 ± 0.028	0.363 ± 0.054	1.0
	-	1	0.574 ± 0.028	0.846 ± 0.100	1.5
	-	3	0.961 ± 0.096	1.517 ± 0.182	1.6
	-	5	1.221 ± 0.073	2.103 ± 0.119	1.7
	Adenosine	5	1.198 ± 0.039	1.819 ± 0.107	NA

- =no inhibitor; CNT=concentrative nucleoside transporter; ENT=equilibrative nucleoside transporter; ISL=islatravir; KHB=Krebs Henseleit Buffer; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-CNT2=MDCKII cells stably expressing human CNT2; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; NBMPR=S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine; LSC=liquid scintillation counting.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (2 µM) into MDCKII and MDCKII-CNT2 cells was measured. [^{3}H]Uridine (1 µM) was used as a positive control substrate and adenosine (100 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-CNT2 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold sodium-free KHB with NBMPR (to inhibit endogenous ENT transport) and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with sodium-free KHB with NBMPR. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.11　MDCKII 細胞における ISL のヒト CTN3に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.9: PK031]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL into MDCKII cells stably expressing CNT3				
Analytes	[^{14}C]ISL, [^{3}H]Uridine				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-CNT3 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]Uridine	-	5	0.142 ± 0.030	10.030 ± 0.251	70.4
	Adenosine	5	0.128 ± 0.025	0.851 ± 0.115	NA
[^{14}C]ISL	-	0	0.375 ± 0.028	0.556 ± 0.055	1.5
	-	1	0.574 ± 0.028	1.825 ± 0.182	3.2
	-	3	0.961 ± 0.096	4.344 ± 0.340	4.5
	-	5	1.221 ± 0.073	6.556 ± 0.464	5.4
	Adenosine	5	1.198 ± 0.039	2.747 ± 0.281	NA

- =no inhibitor; CNT=concentrative nucleoside transporter; ENT=equilibrative nucleoside transporter; ISL=islatravir; KHB=Krebs Henseleit Buffer; LSC=liquid scintillation counting; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-CNT3=MDCKII cells stably expressing human CNT3; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; NBMPR=S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (2 µM) into MDCKII and MDCKII-CNT3 cells was measured. [^{3}H]Uridine (1 µM) was used as a positive control substrate and adenosine (100 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-CNT3 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold sodium-free KHB with NBMPR (to inhibit endogenous ENT transport) and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with sodium-free KHB with NBMPR. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.12 MDCKII 細胞における ISL のヒト ENT1に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.9: PK031]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL into MDCKII cells stably expressing ENT1				
Analytes	[^{14}C]ISL, [^{3}H]Adenosine				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-ENT1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]Adenosine	-	5	0.836 ± 0.118	22.572 ± 2.944	27.0
	NBMPR	5	0.049 ± 0.005	2.192 ± 0.088	NA
[^{14}C]ISL	-	0	0.481 ± 0.060	0.421 ± 0.030	0.9
	-	1	0.773 ± 0.077	0.601 ± 0.054	0.8
	-	3	1.074 ± 0.104	0.747 ± 0.118	0.7
	-	5	1.675 ± 0.161	0.696 ± 0.045	0.4
	NBMPR	5	0.967 ± 0.133	1.709 ± 0.108	NA

- =no inhibitor; ENT=equilibrative nucleoside transporter; ISL=islatravir; KHB=Krebs Henseleit Buffer; LSC=liquid scintillation counting; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-ENT1=MDCKII cells stably expressing human ENT1; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; NBMPR=S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (2 µM) into MDCKII and MDCKII-ENT1 cells was measured. [^{3}H]Adenosine (0.1 µM) was used as a positive control substrate and NBMPR (0.1 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-ENT1 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold sodium-free KHB with NBMPR (to inhibit endogenous ENT transport) and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with sodium-free KHB with NBMPR. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.13　MDCKII 細胞における ISL のヒト ENT2に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.9: PK031]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of [^{14}C]ISL into MDCKII cells stably expressing ENT2				
Analytes	[^{14}C]ISL, [^{3}H]Adenosine				
Assay	LSC				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-ENT2 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]Adenosine	NBMPR[c] (0.5 µM)	5	0.012 ± 0.001	0.057 ± 0.011	4.7
	NBMPR (10 µM)	5	0.010 ± 0.001	0.018 ± 0.002	NA
[^{14}C]ISL	NBMPR[c] (0.5 µM)	0	0.227 ± 0.084	0.292 ± 0.071	1.3
		1	0.330 ± 0.009	0.341 ± 0.056	1.0
		3	0.433 ± 0.050	0.601 ± 0.114	1.4
		5	0.487 ± 0.086	0.714 ± 0.059	1.5
	NBMPR (10 µM)	5	0.451 ± 0.067	0.600 ± 0.043	NA

ENT=equilibrative nucleoside transporter; ISL=islatravir; KHB=Krebs Henseleit Buffer; LSC=liquid scintillation counting; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-ENT2=MDCKII cells stably expressing human ENT2; min=minute(s); n=number; NA=not applicable. NBMPR=S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine.

Note: Uptake of [^{14}C]ISL (1 µM) into MDCKII and MDCKII-ENT2 cells was measured. [^{3}H]Adenosine (0.1 µM) was used as a positive control substrate and NBMPR (0.5 or 10 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-ENT2 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold sodium-free KHB with NBMPR (to inhibit endogenous ENT transport) and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with sodium-free KHB with NBMPR. The radioactivity in the cell pellets was determined by LSC.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of 10 µM inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

[c] NBMPR (0.5 µM) was used to inhibit endogenous transport in MDCKII cells.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.14　LLC-PK1細胞における M4のヒト P-gp に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]			
Type of Study	Transporter phenotyping			
Methods	Bi-directional transport of M4 across LLC-PK1 cell monolayers stably expressing MDR1 P-gp			
Analytes	M4, [^{3}H]Verapamil, [^{3}H]Mannitol			
Assay	LC-MS/MS, LSC			
Compound	**Concentration (µM)**	**Human LLC-MDR1 B-A/A-B Ratio[a,b]**	**LLC-PK1 B-A/A-B Ratio[a,b]**	**LLC-PK1 P_{app} (× 10^{-6} cm/s)[a,c]**
[^{3}H]Verapamil	1.0	10.2	1.1	29.0
[^{3}H]Mannitol	5.0	0.8	1.0	1.6
M4	0.1	0.5	1.0	1.2
	1.0	0.9	0.6	1.0

A-B=apical–basolateral; B-A=basolateral–apical; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLC-PK1=Lilly Laboratories cell porcine kidney epithelial 1; LSC=liquid scintillation counting; MDR1=multidrug resistance protein 1; min=minute(s); n=number; P_{app}=apparent permeability; P-gp=P-glycoprotein.

Note: Bi-directional transport of M4 (0.1 and 1 µM) was measured across monolayers LLC-PK1 and LLC-MDR1 cells at 37°C. Bi-directional transport of [^{3}H]verapamil (1 µM) was measured in parallel as a positive control and [^{3}H]mannitol (5 µM) as a low permeability reference.

Note: Due to the low passive permeability of M4 (P_{app} 1.0–1.2 × 10^{-6} cm/s), it could not reliably be determined whether M4 was a substrate of human P-glycoprotein.

[a] Values represent the mean of n=3.

[b] The B-A/A-B ratio was calculated by dividing the P_{app} from B to A by the P_{app} from A to B.

[c] The P_{app} reported is the average of the P_{app} for transport from A to B and P_{app} for transport from B to A values.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.15　Sf9細胞の膜小胞における M4のヒト P-gp に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]						
Type of Study	Transporter phenotyping						
Method	Uptake of M4 into Sf9 membrane vesicles containing human MDR1 P-gp						
Analytes	[^{3}H]N-methyl-quinidine, M4						
Assay	LSC, LC-MS/MS						
			Control vesicles		**MDR1 P-gp vesicles**		
		Time	**AMP[a,b]**	**ATP[b]**	**AMP[a,b]**	**ATP[b]**	**Fold Difference between ATP and AMP[c]**
Substrate	**Inhibitor**	**(min)**	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	
[^{3}H]N-methyl-quinidine	-	10	20.857 ± 0.944	31.971 ± 4.280	27.177 ± 4.918	274.32 ± 6.872	10.1
	Cyclosporin A	10	20.182 ± 1.706	25.012 ± 1.679	17.984 ± 1.237	31.917 ± 2.189	NA
M4	-	0	0.382 ± 0.076	0.297 ± 0.019	0.344 ± 0.071	0.872 ± 0.469	2.5
	-	1	0.453 ± 0.109	0.554 ± 0.125	0.464[d]	0.836 ± 0.121	1.8
	-	2	0.541 ± 0.167	0.892 ± 0.172	0.685 ± 0.101	0.884 ± 0.126	1.3
	-	5	1.219 ± 0.714	1.826 ± 0.436	1.046 ± 0.066	1.407[d]	1.3
	-	10	1.232 ± 0.110	2.650 ± 0.424	1.302 ± 0.283	2.595 ± 0.359	2.0
	Cyclosporin A	10	1.197 ± 0.219	2.516 ± 0.133	1.221 ± 0.165	2.302 ± 0.208	NA

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.15　Sf9 細胞の膜小胞における M4 のヒト P-gp に対する基質認識性の評価（続き）

Test Article: ISL Metabolite M4

- =no inhibitor; AMP=adenosine monophosphate; ATP=adenosine triphosphate; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC=liquid scintillation counting; MDR1=multidrug resistance protein 1; ISL=islatravir; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; P-gp=P-glycoprotein; Sf9=Spodoptera frugiperda.

Note: Time- and ATP-dependent uptake of M4 (2 μM) into Sf9 membrane vesicles containing human MDR1 P-gp or control vesicles was measured. [^{3}H]N-methyl-quinidine (0.5 μM) was used as a positive control substrate and cyclosporin A (10 μM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDR1 P-gp or control vesicles (with AMP or ATP), followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold stop buffer, and reaction mixtures were transferred to a glass fiber filter plate under vacuum and washed five times with ice-cold stop buffer. The radioactivity of the control compound in the cell pellets was determined by liquid scintillation counting, and the test compound was analyzed by LC-MS/MS.

[a] AMP (12.5 mM) used as negative control in the presence of an ATP-regenerating system.

[b] Values represent mean ± standard deviation (n=3) unless otherwise indicated.

[c] Fold difference is calculated by dividing the ATP-dependent uptake by the AMP-dependent uptake in MDR1 P-gp vesicles. Fold of uptake is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control vesicles.

[d] Values represent mean of n=2 replicates.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.16 MDCKII 細胞における M4のヒト BCRP に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Bi-directional transport of M4 across MDCKII cell monolayers stably expressing BCRP				
Analytes	M4, Prazosin				
Assay	LC-MS/MS				
Compound	**Concentration (µM)**	**Inhibitor**	**MDCKII-BCRP B-A/A-B Ratio[a,b]**	**MDCKII B-A/A-B Ratio[a,b]**	**MDCKII P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm/s)[a,c]**
Prazosin	1.0	-	14.9	1.0[d]	31.1[d]
		Ko143	0.8	0.7	
M4	0.5	-	1.5[d]	1.3	1.0
		Ko143	1.1	1.1	
	1.0	-	1.0	0.8	1.0
		Ko143	1.7	0.8	
	2.0	-	1.3	1.1	1.0
		Ko143	0.6[d]	1.0	

- =no inhibitor; A-B=apical–basolateral; B-A=basolateral–apical; BCRP=breast cancer resistance protein; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; n=number; P_{app}=apparent permeability.

Note: Bi-directional transport of M4 (0.5 to 2 µM) was measured across monolayers MDCKII and MDCKII-BCRP cells at 37°C, in the absence and presence of the BCRP inhibitor Ko143 (5 µM). Bi-directional transport of prazosin (1 µM) was measured in parallel as a positive control.

Note: Due to the low passive permeability of M4 (P_{app} 1.0×10^{-6} cm/s), it could not reliably be determined whether M4 was a substrate of human BCRP.

[a] Values represent the mean of n=3 unless otherwise indicated.

[b] The B-A/A-B ratio was calculated by dividing the P_{app} from B to A by the P_{app} from A to B.

[c] The P_{app} reported is the average of the P_{app} for transport from A to B and P_{app} for transport from B to A values.

[d] Value represent mean of n=2.

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.17　Sf9細胞の膜小胞における M4のヒト BCRP に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]						
Type of Study	Transporter phenotyping						
Method	Uptake of M4 into Sf9 membrane vesicles containing human BCRP						
Analytes	[^{3}H]Methotrexate, M4						
Assay	LSC, LC-MS/MS						
			Control vesicles		**BCRP vesicles**		
			AMP[a,b]	**ATP[b]**	**AMP[a,b]**	**ATP[b]**	**Fold Difference between ATP and AMP[c]**
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	**(pmol/mg protein)**	
[^{3}H]Methotrexate	-	10	75.972 ± 3.830	168.617 ± 13.189	122.068 ± 5.619	1155.570 ± 61.886	9.5
	Ko143	10	76.443 ± 3.268	153.385 ± 15.573	55.336 ± 30.379	167.219 ± 10.003	NA
M4	-	0	1.104 ± 0.060	1.261 ± 0.285	BLQ[d]	2.437 ± 1.562	ND[e]
	-	1	1.029 ± 0.095	1.211 ± 0.281	BLQ[d]	5.952 ± 0.223	ND[e]
	-	2	1.149 ± 0.197	1.405 ± 0.176	1.299 ± 0.340	14.723 ± 0.798	11.3
	-	5	1.373 ± 0.117	1.840 ± 0.384	1.013 ± 0.286	28.104 ± 1.108	27.7
	-	10	1.069 ± 0.032	2.661 ± 0.326	1.893 ± 0.155	41.000 ± 0.720	21.7
	Ko143	10	1.197 ± 0.108	2.845 ± 0.497	1.296 ± 0.029	1.883 ± 0.245	NA

C Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.17　Sf9 細胞の膜小胞における M4 のヒト BCRP に対する基質認識性の評価（続き）

Test Article: ISL Metabolite M4

- =no inhibitor; AMP=adenosine monophosphate; ATP=adenosine triphosphate; BCRP=breast cancer resistance protein; BLQ= below the lower limit of quantification; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC=liquid scintillation counting; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; ND=not determined; Sf9=spodoptera frugiperda.

Note: Time- and ATP-dependent uptake of M4 (2 µM) into Sf9 membrane vesicles containing human BCRP or control vesicles was measured. [^{3}H]Methotrexate (10 µM) was used as a positive control substrate and Ko143 (10 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to BCRP or control vesicles (with AMP or ATP), followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold stop buffer, and reaction mixtures were transferred to a glass fiber filter plate under vacuum and washed five times with ice-cold stop buffer. The radioactivity of the control compound in the cell pellets was determined by liquid scintillation counting, and the test compound was analyzed by LC-MS/MS.

[a] AMP (12.5 mM) used as negative control in the presence of an ATP-regenerating system.

[b] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[c] Fold difference is calculated by dividing the ATP-dependent uptake by the AMP-dependent uptake in BCRP vesicles. Fold of uptake is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control vesicles.

[d] Data are not available because the uptake is below the limit of quantification of 0.06 nM which is equivalent to 0.012 pmol/10^6 cells.

[e] Calculations not determined due to limited number of replicates.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.18 MDCKII 細胞における M4のヒト OAT1に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of M4 into MDCKII cells stably expressing OAT1				
Analytes	[^{3}H]*p*-Aminohippuric acid; M4				
Assay	LSC, LC-MS/MS				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-OAT1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]*p*-Aminohippuric acid	-	10	0.828 ± 0.056	5.718 ± 0.250	6.9
	Probenecid	10	0.737 ± 0.036	0.805 ± 0.065	NA
M4	-	0	0.018 ± 0.001	0.031[c]	1.7
	-	5	0.050 ± 0.010	0.110 ± 0.019	2.2
	-	10	0.039 ± 0.006	0.116 ± 0.011	3.0
	-	15	0.040 ± 0.003	0.137 ± 0.017	3.5
	-	20	0.080 ± 0.009	0.150 ± 0.010	1.9
	Probenecid	20	0.082 ± 0.005	0.139 ± 0.015	NA

- =no inhibitor; DPBS=Dulbecco's phosphate buffered saline; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC=liquid scintillation counting; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-OAT1=MDCKII cells stably expressing human OAT1; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; OAT1=organic anion transporter 1.

Note: Uptake of M4 (2 µM) into MDCKII and MDCKII-OAT1 cells was measured. [^{3}H]*p*-Aminohippuric acid (1 µM) was used as a positive control substrate and probenecid (1 mM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-OAT1 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold DPBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with DPBS. The radioactivity of the control compound in the cell pellets was determined by liquid scintillation counting, and the test compound was analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3) unless otherwise indicated.

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

[c] Value represents mean of n=2.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.19 MDCKII 細胞における M4のヒト OAT3に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of M4 into MDCKII cells stably expressing OAT3				
Analytes	[^{3}H]Estrone sulfate; M4				
Assay	LSC, LC-MS/MS				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**MDCKII Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**MDCKII-OAT3 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{3}H]Estrone sulfate	-	10	0.537 ± 0.049	27.506 ± 2.700	51.2
	Probenecid	10	0.544 ± 0.042	0.502 ± 0.368	NA
M4	-	0	0.018 ± 0.001	1.140 ± 0.035	63.1
	-	5	0.050 ± 0.010	5.187 ± 1.097	103.0
	-	10	0.039 ± 0.006	6.400 ± 0.480	164.9
	-	15	0.040 ± 0.003	6.745 ± 0.292	170.5
	-	20	0.080 ± 0.009	6.627 ± 0.469	82.4
	Probenecid	20	0.082 ± 0.005	0.339 ± 0.048	NA

- =no inhibitor; DPBS=Dulbecco's phosphate buffered saline; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC=liquid scintillation counting; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDCKII-OAT3=MDCKII cells stably expressing human OAT3; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; OAT3=organic anion transporter 1.

Note: Uptake of M4 (2 µM) into MDCKII and MDCKII-OAT3 cells was measured. [^{3}H]Estrone sulfate (1 µM) was used as a positive control substrate and probenecid (1 mM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to MDCKII and MDCKII-OAT3 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold DPBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with DPBS. The radioactivity of the control compound in the cell pellets was determined by liquid scintillation counting, and the test compound was analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.20 CHO-K1細胞における M4のヒト OCT2に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of M4 into CHO-K1 cells stably expressing OCT2				
Analytes	[^{14}C]Tetraethylammonium; M4				
Assay	LSC, LC-MS/MS				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**CHO-K1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**CHO-K1-OCT2 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{14}C]Tetraethylammonium	-	10	0.244 ± 0.018	0.869 ± 0.077	3.6
	Quinidine	10	0.236 ± 0.058	0.280 ± 0.078	NA
M4	-	0	0.112 ± 0.035	0.054[c]	0.5
	-	5	0.079[c]	0.060[c]	0.8
	-	10	0.077 ± 0.019	0.054 ± 0.004	0.7
	-	15	0.070 ± 0.014	0.065 ± 0.017	0.9
	-	20	0.093 ± 0.009	0.088 ± 0.010	0.9
	Quinidine	20	0.085 ± 0.017	0.076 ± 0.021	NA

- =no inhibitor; DPBS=Dulbecco's phosphate buffered saline; CHO-K1=Chinese hamster ovary-K1; CHO-K1-OCT2=CHO-K1 cells stably expressing OCT2; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography tandem mass spectrometry; LSC=liquid scintillation counting; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; OCT2=organic cation transporter 2.

Note: Uptake of M4 (2 µM) into CHO-K1 and CHO-K1-OCT2 cells was measured. [^{14}C]Tetraethylammonium (1 µM) was used as a positive control substrate and quinidine (100 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to CHO-K1 and CHO-K1-OCT2 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold DPBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with DPBS. The radioactivity of the control compound in the cell pellets was determined by LSC, and the test compound was analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3) unless otherwise indicated.

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

[c] Value represents mean of n=2.

Confidential

2.6.5.18　ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）

2.6.5.18.21　CHO-K1細胞における M4のヒト MATE1に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of M4 into CHO-K1 cells stably expressing MATE1				
Analytes	[^{14}C]Metformin; M4				
Assay	LSC, LC-MS/MS				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**CHO-K1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**CHO-K1-MATE1 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{14}C]Metformin	-	10	0.438 ± 0.050	9.374 ± 0.523	21.4
	Pyrimethamine	10	0.397 ± 0.021	0.483 ± 0.047	NA
M4	-	0	BLQ[c]	0.010[e]	ND[c]
	-	5	0.011[d]	0.024 ± 0.001	2.3
	-	10	0.015 ± 0.004	0.028 ± 0.006	1.9
	-	15	0.026 ± 0.005	0.038 ± 0.002	1.5
	-	20	0.030 ± 0.003	0.026 ± 0.009	0.9
	Pyrimethamine	20	0.040 ± 0.029	0.024 ± 0.002	NA

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.21 CHO-K1 細胞における M4 のヒト MATE1 に対する基質認識性の評価（続き）

Test Article: ISL Metabolite M4

- =no inhibitor; BLQ=below the lower limit of quantification; CHO-K1=Chinese hamster ovary-K1; CHO-K1-MATE1=CHO-K1 cells stably expressing MATE1; DPBS=Dulbecco's phosphate buffered saline; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC=liquid scintillation counting; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; min=minute(s); n=number; NA=not applicable; ND=not determined.

Note: Uptake of M4 (2 μM) into CHO-K1 and CHO-K1-MATE1 cells was measured. [^{14}C]Metformin (5 μM) was used as a positive control substrate and pyrimethamine (5 μM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to CHO-K1 and CHO-K1-MATE1 cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold DPBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with DPBS. The radioactivity of the control compound in the cell pellets was determined by LSC, and the test compound was analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3) unless otherwise indicated.

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

[c] Data are not available because the uptake is below the limit of quantification of 0.0488 nM which is equivalent to 0.010 pmol/10^6 cells.

[d] Value from n=1 measurement.

C Confidential

2.6.5.18 ISL 及び M4 のヒト薬物トランスポーターに対する基質認識性の評価（続き）
2.6.5.18.22 HEK-293細胞における M4のヒト MATE2K に対する基質認識性の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.6: PK020]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	Uptake of M4 into HEK293 cells stably expressing MATE2K				
Analytes	[^{14}C]Metformin; M4				
Assay	LSC, LC-MS/MS				
Substrate	**Inhibitor**	**Time (min)**	**HEK293 Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**HEK293-MATE2K Cells[a] (pmol/10^6 cells)**	**Fold Difference Compared to Parental Cells[b]**
[^{14}C]Metformin	-	10	2.378 ± 0.134	12.411 ± 0.374	5.2
	Pyrimethamine	10	1.531 ± 0.124	2.415 ± 0.058	NA
M4	-	0	0.109 ± 0.015	0.160 ± 0.049	1.5
	-	5	0.148 ± 0.031	0.292 ± 0.019	2.0
	-	10	0.149 ± 0.019	0.368 ± 0.006	2.5
	-	15	0.143 ± 0.037	0.413 ± 0.023	2.9
	-	20	0.172 ± 0.019	0.423 ± 0.031	2.5
	Pyrimethamine	20	0.143 ± 0.008	0.241 ± 0.027	NA

- =no inhibitor; DPBS=Dulbecco's phosphate buffered saline; HEK=human embryonic kidney; HEK293-MATE2K=HEK293 cells stably expressing MATE2K; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC=liquid scintillation counting; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; min=minute(s); n=number; NA=not applicable.

Note: Uptake of M4 (2 µM) into HEK293 and HEK293-MATE2K cells was measured. [^{14}C]Metformin (5 µM) was used as a positive control substrate and pyrimethamine (5 µM) as a positive control inhibitor. Uptake was initiated by the addition of the substrate solution to HEK293 and HEK293-MATE2K cells, followed by incubation at 37°C for the indicated time. Uptake was stopped by the addition of ice-cold DPBS and centrifugation at 4°C. Cell pellets were washed three times with DPBS. The radioactivity of the control compound in the cell pellets was determined by LSC and the test compound was analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean ± standard deviation (n=3).

[b] Fold difference was calculated by dividing the uptake in transporter transfected cells over the uptake in control cells at specific time points. Fold difference was not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

C Confidential

2.6.5.19 ISL 及び M4によるヒト CYP 分子種の阻害

2.6.5.19.1 ISL によるヒト CYP 分子種の可逆的阻害

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.6.7: PK035]			
Type of Study	Reversible inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A by ISL			
Methods	Individual probe substrates of CYP enzymes were incubated with human liver microsomes enriched with NADPH, in the presence of ISL (0.05 to 200 µM) or positive control inhibitors to measure reversible inhibition of CYP isoforms			
Analytes	Acetaminophen (CYP1A2), (±)-Hydroxybupropion (CYP2B6), *N*-Desethylamodiaquine (CYP2C8), 4′-Hydroxydiclofenac (CYP2C9), (±)-4-Hydroxymephenytoin (CYP2C19), Dextrorphan (CYP2D6), 1Hydroxymidazolam (CYP3A), 6β-Hydroxytestosterone (CYP3A)			
Assay	LC-MS/MS			
CYP	**Reaction**	**Control Inhibitor (**IC_{50}, µM)	**ISL (**IC_{50}, µM)	**Study Number**
1A2	Phenacetin *O*-Deethylation	α-Naphthoflavone (0.021)	>100	[4.2.2.3.5: PK002]
2B6	Bupropion Hydroxylation	Ticlopidine (0.53)	>100	
2C8	Amodiaquine *N*-Deethylation	Montelukast (0.23)	>100	
2C9	Diclofenac 4′-Hydroxylation	Sulfaphenazole (0.75)	>100	
2C19	*S*-Mephenytoin 4′-Hydroxylation	Benzylnirvanol (0.30)	>100	
2D6	Dextromethorphan *O*-Demethylation	Quinidine (0.12)	>100	
3A	Midazolam 1′-Hydroxylation	Ketoconazole (0.019)	>200	[4.2.2.6.7: PK035]
3A	Testosterone 6β-Hydroxylation	Ketoconazole (0.030)	>200	

CYP=cytochrome P450; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); NADPH=reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

Note: Pooled human liver microsomes (0.25 mg/mL) were incubated in a reaction mixture (0.2 mL final volume) containing the appropriate CYP probe substrate and ISL (0.05 to 200 µM) in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) with 3.14 mM $MgCl_2$ and an NADPH-regenerating system for 3 to 20 min (37°C). The reactions were terminated with the addition of 200 µL of appropriate organic solvent containing internal standard. The samples were vortexed and centrifuged. The supernatants were analyzed by LC-MS/MS.

C Confidential

2.6.5.19 ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の阻害（続き）
2.6.5.19.2 M4によるヒト CYP 分子種の可逆的阻害

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.8: PK023]		
Type of Study	Reversible inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A by M4		
Methods	Individual probe substrates of CYP enzymes were incubated with human liver microsomes enriched with NADPH, in the presence of islatravir metabolite M4 (0.13-100 µM) or positive control inhibitors to measure reversible inhibition of CYP isoforms		
Analytes	Acetaminophen (CYP1A2), (±)-Hydroxybupropion (CYP2B6), *N*-Desethylamodiaquine (CYP2C8), 4′-Hydroxydiclofenac (CYP2C9), (±)-4-Hydroxymephenytoin (CYP2C19), Dextrorphan (CYP2D6), 1'-Hydroxymidazolam (CYP3A), 6β-Hydroxytestosterone (CYP3A)		
Assay	LC-MS/MS		
CYP	**Reaction**	**Control Inhibitor (IC_{50}, µM)**	**M4 (IC_{50}, µM)**
1A2	Phenacetin *O*-Deethylation	α-Naphthoflavone (0.0089)	>100
2B6	Bupropion Hydroxylation	Ticlopidine (0.53)	>100
2C8	Amodiaquine *N*-Deethylation	Montelukast (0.17)	>100
2C9	Diclofenac 4′-Hydroxylation	Sulfaphenazole (0.73)	>100
2C19	*S*-Mephenytoin 4′-Hydroxylation	Benzylnirvanol (0.20)	>100
2D6	Dextromethorphan *O*-Demethylation	Quinidine (0.17)	>100
3A	Midazolam 1′-Hydroxylation	Ketoconazole (0.022)	>100
3A	Testosterone 6β-Hydroxylation	Ketoconazole (0.025)	>100

CYP=cytochrome P450; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); NADPH=reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

Note: Pooled human liver microsomes (0.25 mg/mL) was incubated in a reaction mixture (0.2 mL final volume) containing the appropriate CYP probe substrate and ISL metabolite M4 (0.13 to 100 µM) in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) with 3.14 mM $MgCl_2$ and an NADPH-regenerating system for 3 to 30 min (37°C). The reactions were terminated with the addition of the appropriate volume of acetonitrile:water (50:50) with 2.5% formic acid containing an appropriate internal standard. The samples were vortexed and centrifuged. The supernatants were analyzed by LC-MS/MS.

C Confidential

2.6.5.19　ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の阻害（続き）
2.6.5.19.3　ISL によるヒト CYP 分子種の時間依存的阻害

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002] [4.2.2.6.9: PK033]
Type of Study	Time-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A by ISL in human liver microsomes
Methods	Selective probe substrates of CYP isoforms were incubated in pooled human liver microsomes enriched with NADPH in the presence of ISL (10 and 50 µM) or the positive control inhibitors to assess the potential of TDI for CYP isoforms
Analytes	Acetaminophen (CYP1A2), 8'-Hydroxyefavirenz (CYP2B6), *N*-Desethylamodiaquine (CYP2C8), 4′-Hydroxydiclofenac (CYP2C9), (±)-4-Hydroxymephenytoin (CYP2C19), 1'-Hydroxybufuralol (CYP2D6), 6β-Hydroxytestosterone (CYP3A)
Analytical Method	LC-MS/MS

CYP Isoform	**Reaction**	**k_{obs} (min^{-1})[a]**					**Study Number**
		Negative control inhibitor (solvent)	**Positive control inhibitor**		**ISL (10 µM)**	**ISL (50 µM)**	
CYP1A2	Phenacetin *O*-Deethylation	0.0087	Furafyline	0.0243 (0.5 µM) 0.0919 (8 µM)	0.0095	0.0101	[4.2.2.6.9: PK033]
CYP2B6	Efavirenz 8'-Hyroxylation	0.0080	Thio-TEPA	0.0285 (9.4 µM) 0.0322 (150 µM)	0.0098	0.0103	
CYP2C8	Amodiaquine *N*-Deethylation	0.0033	Gemfibrozil glucuronide	0.0081 (3.1 µM) 0.0395 (50 µM)	0.0052	-0.0004[b]	
CYP2C9	Diclofenac 4′-Hydroxylation	0.0024	Tienilic Acid	0.0274 (1.3 µM) 0.1155 (20 µM)	0.0013	0.0037	
CYP2C19	*S*-Mephenytoin 4′-Hydroxylation	0.0043	S-Fluoxetine	0.0053 (15.6 µM) 0.0387 (250 µM)	0.0044	0.0028	
CYP2D6	Bufuralol 1'-Hydroxylation	0.0098	Paroxetine	0.0299 (0.63 µM) 0.0990 (10 µM)	0.0094	0.0109	
CYP3A	Testosterone 6β-Hydroxylation	0.004	Mifepristone	0.050 (10 µM) 0.050 (50 µM)	0.005	0.005	[4.2.2.3.5: PK002]

C Confidential

2.6.5.19　ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の阻害（続き）
2.6.5.19.3　　ISL によるヒト CYP 分子種の時間依存的阻害（続き）

Test Article: ISL

CYP=cytochrome P450; ISL=islatravir; k_{obs}=observed rate constant; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); n=number; NADPH=reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; TDI=time-dependent inhibition; TEPA=*N*,*N*',*N*''-triethylenephosphoramide.

Note: The enzyme activities that were used to evaluate ISL inhibition of CYPs included phenacetin *O*-deethylase (CYP1A2), efavirenz 8'-hydroxylase (CYP2B6), amodiaquine *N*-deethylase (CYP2C8), diclofenac 4'-hydroxylase (CYP2C9), (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19), bufuralol 1'-hydroxylase (CYP2D6), and testosterone 6β-hydroxylase (CYP3A). ISL was preincubated with human liver microsomes (1 mg/mL for CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A; 2 mg/mL for CYP2C19) enriched with NADPH (1 mM) in 100 mM phosphate buffer at 37°C at selected time points from 0 up to 30 min. At each time point, aliquots of the reaction mixture were diluted with the same buffer containing probe substrates. The secondary incubations were continued for a period of time for each specific isoform from 4 to 25 min at 37°C. The reactions were terminated with the addition of the appropriate volume of organic solvent containing an appropriate internal standard. The samples were vortexed and centrifuged. The supernatants were analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean of n=3 incubations.

[b] Linear regression of the natural log of percentage activity remaining vs. time plot exhibited a positive slope; therefore, the k_{obs} value was reported as a negative value.

C Confidential

2.6.5.19 ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の阻害（続き）

2.6.5.19.4 M4によるヒト CYP 分子種の時間依存的阻害

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.11: PK014] [4.2.2.6.10: PK034]						
Type of Study	Time-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A by M4 in human liver microsomes						
Methods	Probe substrates of CYP isoforms were incubated in pooled human liver microsomes enriched with NADPH in the presence of M4 (10 and 50 µM) or the positive control inhibitors to assess the potential of TDI for CYP isoforms						
Analytes	Acetaminophen (CYP1A2), 8'-Hydroxyefavirenz (CYP2B6), *N*-Desethylamodiaquine (CYP2C8), 4′-Hydroxydiclofenac (CYP2C9), (±)-4-Hydroxymephenytoin (CYP2C19), 1'-Hydroxybufuralol (CYP2D6), 6β-Hydroxytestosterone (CYP3A)						
Analytical Method	LC-MS/MS						
CYP Isoform	**Reaction**	**k_{obs} (min^{-1})[a]**					**Study Number**
		Negative control inhibitor (solvent)	**Positive control inhibitor**		**M4 (10 µM)**	**M4 (50 µM)**	
CYP1A2	Phenacetin *O*-Deethylation	0.0087	Furafyline	0.0243 (0.5 µM) 0.0919 (8 µM)	0.0107	0.0106	[4.2.2.6.10: PK034]
CYP2B6	Efavirenz 8'-Hyroxylation	0.0080	Thio-TEPA	0.0285 (9.4 µM) 0.0322 (150 µM)	0.0102	0.0085	
CYP2C8	Amodiaquine *N*-Deethylation	0.0033	Gemfibrozil glucuronide	0.0081 (3.1 µM) 0.0395 (50 µM)	0.0046	0.0033	
CYP2C9	Diclofenac 4′-Hydroxylation	0.0024	Tienilic Acid	0.0274 (1.3 µM) 0.1155 (20 µM)	0.0024	0.0033	
CYP2C19	*S*-Mephenytoin 4′-Hydroxylation	0.0043	S-Fluoxetine	0.0053 (15.6 µM) 0.0387 (250 µM)	0.0026	0.0047	
CYP2D6	Bufuralol 1'-Hydroxylation	0.0098	Paroxetine	0.0299 (0.63 µM) 0.0990 (10 µM)	0.0119	0.0124	
CYP3A	Testosterone 6β-Hydroxylation	0.0159	Erythromycin	0.0179 (3 µM) 0.0366 (48 µM)	0.0159	0.0143	
CYP3A	Testosterone 6β-Hydroxylation	0.009	Mifepristone	0.079 (10 µM) 0.066 (50 µM)	0.008	0.008	[4.2.2.6.11: PK014]

C Confidential

2.6.5.19 ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の阻害（続き）

2.6.5.19.4 M4 によるヒト CYP 分子種の時間依存的阻害（続き）

Test Article: ISL Metabolite M4

CYP=cytochrome P450; k_{obs}=observed rate constant; ISL=islatravir; min=minute(s); LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; n=number; NADPH=reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; TDI=time-dependent inhibition; TEPA=*N*,*N*',*N*''-triethylenephosphoramide.

Note: The enzyme activities that were used to evaluate M4 inhibition of CYPs included phenacetin *O*-deethylase (CYP1A2), efavirenz 8'-hydroxylase (CYP2B6), amodiaquine *N*-deethylase (CYP2C8), diclofenac 4'-hydroxylase (CYP2C9), (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19), bufuralol 1'-hydroxylase (CYP2D6), and testosterone 6β-hydroxylase (CYP3A). M4 was preincubated with human liver microsomes (1 mg/mL for CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A; 2 mg/mL for CYP2C19) enriched with NADPH (1 mM) in 100 mM phosphate buffer at 37°C at selected time points from 0 up to 30 min. At each time point, aliquots of the reaction mixture were diluted with the same buffer containing probe substrates. The secondary incubations were continued for a period of time for each specific isoform from 4 to 25 min at 37°C. The reactions were terminated with the addition of the appropriate volume of organic solvent containing an appropriate internal standard. The samples were vortexed and centrifuged. The supernatants were analyzed by LC-MS/MS.

[a] Values represent mean of n=3 incubations.

C Confidential

2.6.5.20 ISL 及び M4によるヒト UGT1A1及び UGT2B7の阻害

2.6.5.20.1 ISL によるヒト UGT1A1及び UGT2B7の阻害

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.6.12: PK007] [4.2.2.6.13: PK038]		
Type of Study	In vitro inhibition of UGT1A1 and UGT2B7		
Methods	In vitro incubation of estradiol or AZT with human liver microsomes enriched with UDPGA, in the presence of ISL (0.78 to 100 µM) or the positive control inhibitor		
Analyte	Estradiol 3-glucuronide (UGT1A1), AZT-ß-D-glucuronide (UGT2B7)		
Assay	LC-MS/MS		
UGT Isoform	**Substrate**	**Inhibitor**	**IC_{50} (µM)**
UGT1A1	Estradiol	Nicardipine	4.01 ± 0.80[a]
UGT1A1	Estradiol	ISL	>100[b]
UGT2B7	AZT	Mefenamic Acid	2.3
UGT2B7	AZT	ISL	>100[b]

AZT=3'-azido-3'-deoxythymidine; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; HEPES=2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); UDPGA=uridine-diphosphate-glucuronic acid; UGT1A1=uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1; UGT2B7=uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1.

Note: UGT1A1inhibition – Pooled human liver microsomes (0.5 mg/mL) were incubated with 20 µM estradiol, 5 mM UDPGA, 9 mM $MgCl_2$ and 25 µg/mL alamethicin in 200 µL of 81 mM HEPES buffer, pH 7.0 at 37°C for 20 min. Estradiol glucuronidation was quantified in the absence and presence of increasing concentrations of either ISL (0.78 to 100 µM) or nicardipine (0.78 to 10 µM), a known inhibitor of UGT1A1. Ice-cold methanol was added at the end of the incubation to precipitate the microsomal protein. Samples were centrifuged, and the supernatant was transferred to a new plate for analysis of estradiol 3-glucuronide by LC-MS/MS.

Note: UGT2B7 inhibition – Pooled human liver microsomes (0.01 mg/mL) were incubated with 500 µM 3'-azido-3'-deoxythymidine, 5 mM UDPGA, 8 mM $MgCl_2$, and 25 µg/mL alamethicin in 400 µL of 100 mM Tris buffer, pH 7.5 at 37°C for 60 min. 3'-azido-3'-deoxythymidine glucuronidation was quantified in the absence and presence of increasing concentrations of either ISL (0.78 to 100 µM) or mefenamic acid (0.78 to 10 µM), a known inhibitor of UGT2B7. Acetonitrile was added at the end of the incubation to precipitate the microsomal protein. Samples were centrifuged, and the supernatant was transferred to a new plate for analysis of 3'-azido-3'-deoxythymidine ß-D-glucuronide by LC-MS/MS.

[a] Value represents IC_{50} ± standard error.

[b] No inhibition of UGT activity was observed over the 0.78 to 100 µM concentration range of ISL.

C Confidential

2.6.5.20 ISL 及び M4 によるヒト UGT1A1 及び UGT2B7 の阻害（続き）
2.6.5.20.2 M4によるヒト UGT1A1及び UGT2B7の阻害

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.14: PK013] [4.2.2.6.15: PK039]		
Type of Study	In vitro inhibition of UGT1A1 and UGT2B7		
Methods	In vitro incubation of estradiol with human liver microsomes enriched with UDPGA, in the presence of ISL metabolite M4 (0.78 to 100 µM) or the positive control inhibitor.		
Analyte	Estradiol 3-glucuronide (UGT1A1), AZT-ß-D-glucuronide (UGT2B7)		
Assay	LC-MS/MS		
UGT Isoform	**Substrate**	**Inhibitor**	**IC_{50}**
UGT1A1	Estradiol	Nicardipine	2.05 ± 0.11 µM[a]
UGT1A1	Estradiol	M4	>100 µM[b]
UGT2B7	AZT	Mefenamic Acid	0.7 µM
UGT2B7	AZT	ISL	>100 µM[b]

AZT=3'-azido-3'-deoxythymidine; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; HEPES=2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; min=minute(s); UDPGA=uridine-diphosphate-glucuronic acid; UGT1A1=uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1.

Note: UGT1A1 inhibition - Pooled human liver microsomes (0.5 mg/mL) were incubated with 20 µM estradiol, 5 mM UDPGA, 9 mM $MgCl_2$ and 25 µg/mL alamethicin in 200 µL of 75 mM HEPES buffer, pH 7.0 at 37°C for 20 min. Estradiol glucuronidation was quantified in the absence and presence of increasing concentrations of M4 (0.78 to 100 µM) or nicardipine (0.078 to 10 µM), a known inhibitor of UGT1A1. Ice-cold methanol was added at the end of the incubation to precipitate the microsomal protein. Samples were centrifuged, and the supernatant was transferred to a new plate for analysis of estradiol 3-glucuronide by LC-MS/MS.

Note: UGT2B7 inhibition - Pooled human liver microsomes (0.01 mg/mL) were incubated with 500 µM 3'-azido-3'-deoxythymidine, 5 mM UDPGA, 8 mM $MgCl_2$ and 25 µg/mL alamethicin in 400 µL of 100 mM Tris buffer, pH 7.5 at 37°C for 60 min. 3'-azido-3'-deoxythymidine glucuronidation was quantified in the absence and presence of increasing concentrations of either ISL (0.78 to 100 µM) or mefenamic acid (0.78 to 10 µM), a known inhibitor of UGT2B7. Acetonitrile was added at the end of the incubation to precipitate the microsomal protein. Samples were centrifuged, and the supernatant was transferred to a new plate for analysis of 3'-azido-3'-deoxythymidine ß-D-glucuronide by LC-MS/MS.

[a] Value represents IC_{50} ± standard error.

[b] No inhibition of UGT activity was observed over the 0.78 to 100 µM concentration range of M4.

2.6.5.21 ICH M12に基づく ISL による薬物代謝酵素阻害の評価

Test Article: ISL

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between ISL and co-administered substrates of various enzymes based on the ICH M12 guidance (2024)[a]									
Enzyme	**Model**	**IC_{50} (µM)**	**$K_{i,u}$[b] (µM)**	**$C_{max,u}$[c] (µM)**	**Dose/250 mL[d] (µM)**	**$C_{max,u}/K_{i,u}$**	**(Dose/250 mL)/$K_{i,u}$**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**	**Study Number**
Systemic									
CYP1A2	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	[4.2.2.3.5: PK002]
CYP2B6	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2C8	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2C9	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2C19	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2D6	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP3A/midazolam	Basic	>200	>100	0.024	-	<0.0002	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	[4.2.2.6.7: PK035]
CYP3A/testosterone	Basic	>200	>100	0.024	-	<0.0002	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
UGT1A1	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	[4.2.2.6.12: PK007]
UGT2B7	Basic	>100	>50	0.024	-	<0.0005	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	[4.2.2.6.13: PK038]
Intestinal									
CYP3A/midazolam	Basic	>200	>100	-	10.23	-	<0.1	(Dose/250 mL)/$K_{i,u}$ ≥10	[4.2.2.6.7: PK035]
CYP3A/testosterone	Basic	>200	>100	-	10.23	-	<0.1	(Dose/250 mL)/$K_{i,u}$ ≥10	

- =not applicable; C_{max}=observed maximum concentration; $C_{max,u}$= unbound observed maximum concentration; CYP=cytochrome P450; DDI=drug-drug interaction; $f_{u,mic}$=unbound fraction in the microsomal system; $f_{u,p}$=unbound fraction in plasma; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ICH= International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ISL=islatravir; K_i=inhibition constant; $K_{i,u}$=unbound inhibition constant; MW=molecular weight; UGT1A1=uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1; UGT2B7=uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7.

[a] ICH Harmonised Guideline Drug Interaction Studies M12, May 2024.

[b] $K_{i,u}=IC_{50}/2 \times f_{u,mic}$ assuming competitive inhibition, assuming the worst case scenario of K_i=50 or 100 µM, and using a calculated $f_{u,mic}$=1 for ISL [4.3: 07WFGG] .

[c] $C_{max,u}=C_{max} \times f_{u,p}$ where C_{max}=0.025 µM for a single 0.75 mg dose of ISL (MK-8591 P032) [Sec. 2.7.2.2] and $f_{u,p}$=0.97.

[d] Dose/250 mL=0.75 mg/250 mL=10.23 µM (MW=293.3 g/mol for ISL).

2.6.5.22 ICH M12に基づく M4による薬物代謝酵素阻害の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between ISL Metabolite M4 and co-administered substrates of various enzymes based on the ICH M12 guidance (2024)[a]									
Enzyme	**Model**	**IC_{50} (µM)**	**$K_{i,u}$[b] (µM)**	**$C_{max,u}$[c] (µM)**	**Dose/250 mL[d] (µM)**	**$C_{max,u}/K_{i,u}$**	**(Dose/250 mL)/$K_{i,u}$**	**Threshold Cutoff For Potential DDI**	**Study Number**
Systemic									
CYP1A2	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	[4.2.2.6.8: PK023]
CYP2B6	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2C8	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2C9	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2C19	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP2D6	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP3A/midazolam	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
CYP3A/testosterone	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	
UGT1A1	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	[4.2.2.6.14: PK013]
UGT2B7	Basic	>100	>50	0.021	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/K_{i,u}$ ≥0.02	[4.2.2.6.15: PK039]
Intestinal									
CYP3A/midazolam	Basic	>100	>50	-	10.23	-	<0.2	(Dose/250 mL)/$K_{i,u}$ ≥10	[4.2.2.6.8: PK023]
CYP3A/testosterone	Basic	>100	>50	-	10.23	-	<0.2	(Dose/250 mL)/$K_{i,u}$ ≥10	

- =not applicable; C_{max}=observed maximum concentration; $C_{max,u}$= unbound observed maximum concentration; CYP=cytochrome P450; DDI=drug-drug interaction; $f_{u,mic}$=unbound fraction in the microsomal system; $f_{u,p}$=unbound fraction in plasma; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ICH= International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ISL=islatravir; K_i=inhibition constant; $K_{i,u}$=unbound inhibition constant; MW=molecular weight; UGT1A1=uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1; UGT2B7=uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7.

[a] ICH Harmonised Guideline Drug Interaction Studies M12, May 2024.

[b] $K_{i,u}=IC_{50}/2 \times f_{u,mic}$ assuming competitive inhibition, assuming the worst case scenario of K_i=50 or 100 µM, and assuming that the $f_{u,mic}$ for M4 is the same as that for ISL where $f_{u,mic}$=1 [4.3: 07WFGG]

[c] $C_{max,u}=C_{max} \times f_{u,p}$ where the M4 C_{max}=0.022 µM following 0.75 mg dose of ISL (MK-8591 P032) [Sec. 2.7.2.2] and $f_{u,p}$=0.94.

[d] Dose/250 mL= assumes 100% conversion of ISL dose to M4 in the gut=0.75 mg/250 mL=10.23 µM (MW = 293.3 g/mol for ISL).

C Confidential

2.6.5.23 ISL によるヒト薬物トランスポーターの阻害

Test Article: ISL

Type of Study	Transporter inhibition				
Methods	In vitro evaluation of ISL as an inhibitor of human OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, MATE1, MATE2K, MDR1 P-gp, BCRP, BSEP, MRP2, MRP3, and MRP4 transporters				
Analytical Method	LSC				
Transporter	**Test System**	**Probe Substrate**	**IC_{50} (µM)**	**Inhibition at Highest Concentration Tested[a]**	**Study Number**
OATP1B1	HEK293-OATP1B1	[^{3}H]Pitavastatin (0.1 µM)	>300	No inhibition at 300 µM	[4.2.2.6.16: PK032]
OATP1B3	HEK293-OATP1B3	[^{3}H]Bromosulfophthalein (0.1 µM)	>300	2% inhibition at 300 µM	
OCT1	CHO-K1-OCT1	[^{14}C]Metformin (10 µM)	>300	6% inhibition at 300 µM	
OCT2	CHO-K1-OCT2	[^{14}C]Metformin (10 µM)	>100	15% inhibition at 100 µM	[4.2.2.6.4: PK004]
OAT1	MDCKII-OAT1	[^{3}H]Cidofovir (1 µM)	>100	2% inhibition at 100 µM	
OAT3	MDCKII-OAT3	[^{3}H]Estrone Sulfate (1 µM)	>100	31% inhibition at 100 µM	
MATE1	CHO-K1-MATE1	[^{14}C]Metformin (5 µM)	>75	No inhibition at 75 µM	[4.2.2.6.17: PK015]
MATE2K	MDCKII-MATE2K	[^{14}C]Metformin (5 µM)	>75	3% inhibition at 75 µM	
MDR1 P-gp	LLC-MDR1	[^{3}H]N-digoxin (0.1 µM)	>200	No inhibition at 200 µM	[4.2.2.6.18: PK012]
BCRP	Sf9-BCRP	[^{3}H]Methotrexate (10 µM)	>100	35% inhibition at 100 µM	[4.2.2.6.17: PK015]
BSEP	Sf9-BSEP	[^{3}H]Taurocholic acid (1 µM)	>100	No inhibition at 100 µM	[4.2.2.6.4: PK004]
MRP2	Sf9-MRP2	[^{14}C]Ethacrynic acid-glutathione conjugate (1 µM)	>100	10% inhibition at 100 µM	
MRP3	Sf9-MRP3	[^{3}H]Estradiol$_2$-17β glucuronide (1 µM)	>100	6% inhibition at 100 µM	
MRP4	Sf9-MRP4	[^{3}H]Folic acid (10 µM)	>100	No inhibition at 100 µM	

BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; CHO-K1=Chinese hamster ovary-K1; HEK293=human embryonic kidney 293; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; LLC-MDR1=Lilly Laboratories cells stably expressing human multidrug resistance protein 1 (human P-gp); LSC=liquid scintillation counting; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDR1=multidrug resistance protein 1; MRP2=multidrug resistance-associated protein 2; MRP3=multidrug resistance-associated protein 3; MRP4=multidrug resistance-associated protein 4; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; P-gp=P-glycoprotein; Sf9=spodoptera frugiperda.

C Confidential

2.6.5.24 ICH M12に基づく ISL による薬物トランスポーター阻害の評価

Test Article: ISL

Summary Results: Risk Assessment for in vivo DDI's between ISL and co-administered substrates of various transporters based on the ICH M12 guidance (2024)[a]						
Transporter	**$IC_{50,u}$ [b] (μM)**	**$C_{max,inlet,u}$ [c]/$IC_{50,u}$**	**$C_{max,u}$ [d]/$IC_{50,u}$**	**(Dose/250 mL)[e]/$IC_{50,u}$**	**Threshold Cutoff for Potential DDI**	**Study Number**
Systemic						
OATP1B1	>300	<0.0005	-	-	$C_{max,inlet,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	[4.2.2.6.16: PK032]
OATP1B3	>300	<0.0005	-	-	$C_{max,inlet,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
OCT1[f]	>300	<0.0005	-	-	$C_{max,inlet,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
OCT2	>100	-	<0.0003	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	[4.2.2.6.4: PK004]
OAT1	>100	-	<0.0003	-	$C_{,max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
OAT3	>100	-	<0.0003	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
MATE1	>75	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.02	[4.2.2.6.17: PK015]
MATE2K	>75	-	<0.0004	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.02	
Intestinal						
MDR1 P-gp	>200	-	-	<0.06	(Dose/250 mL)[e]/$IC_{50,u}$ ≥10	[4.2.2.6.18: PK012]
BCRP	>100	-	-	<0.2	(Dose/250 mL) [e]/$IC_{50,u}$ ≥10	[4.2.2.6.17: PK015]

- =not applicable; BCRP=breast cancer resistance protein; $C_{max,inlet,u}$=estimated unbound maximum concentration at liver inlet; C_{max}=observed maximum concentration; $C_{max,u}$=unbound maximum concentration; DDI=drug-drug interaction; F_a=fraction absorbed; F_g=fraction escaping gut metabolism; $f_{u,p}$=unbound fraction in plasma; $IC_{50,u}$=unbound half-maximal inhibitory concentration; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Dose/250 mL=theoretical maximum gastrointestinal drug concentration calculated as the dose/250mL; ISL=islatravir; k_a=absorption rate constant; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; MDR1=multi drug resistance protein 1; MW=molecular weight; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; P-gp=P-glycoprotein; Q_h=hepatic blood flow; R_B=blood-to-plasma ratio.

[a] ICH M12 Harmonised Guideline Drug Interaction Studies, May 2024.

[b] $IC_{50,u}$ is assumed equivalent to nominal IC_{50}.

[c] $C_{max,inlet,u}=f_{u,p}$ x $[C_{max} + (F_a \times F_g \times k_a \times dose)/Q_h/R_B]$ where C_{max}=0.025 μM, R_B=1.3, $f_{u,p}$=0.97, Q_h=1616.7 mL/min and assumes $F_a \times F_g$=1 and k_a=0.1 min^{-1} [Sec. 2.7.2.2].

[d] $C_{max,u}=C_{max} \times f_{u,p}$ where C_{max}=0.025 μM for a single 0.75 mg dose of ISL (MK-8591 P032) [Sec. 2.7.2.2] and $f_{u,p}$=0.97.

[e] Dose/250 mL=0.75 mg/250 mL=10.23 μM (MW=293.3 g/mol for ISL).

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

C Confidential

2.6.5.25 M4によるヒト薬物トランスポーターの阻害

Test Article: ISL Metabolite M4

Type of Study	Transporter inhibition				
Methods	In vitro evaluation of M4 as an inhibitor of human OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, MATE1, MATE2K, MDR1 P-gp, BCRP, and BSEP transporters				
Analytical Method	LSC				
Transporter	**Test System**	**Probe Substrate**	**IC_{50} (µM)**	**Inhibition at Highest Concentration Tested[a]**	**Study Number**
OATP1B1	HEK293-OATP1B1	[^{3}H]Pitavastatin (0.1 µM)	>100	No inhibition at 100 µM	[4.2.2.6.19: PK016]
OATP1B3	HEK293-OATP1B3	[^{3}H]Bromosulfophthalein (0.1 µM)	>100	19% inhibition at 100 µM	
OCT1	CHO-K1-OCT1	[^{14}C]Metformin (10 µM)	>100	4% inhibition at 100 µM	
OCT2	CHO-K1-OCT2	[^{14}C]Metformin (10 µM)	>100	No inhibition at 100 µM	
OAT1	MDCKII-OAT1	[^{3}H]Cidofovir (1 µM)	>100	34% inhibition at 100 µM	
OAT3	MDCKII-OAT3	[^{3}H]Estrone Sulfate (1 µM)	>100	30% inhibition at 100 µM	
MATE1	CHO-K1-MATE1	[^{14}C]Metformin (5 µM)	>100	No inhibition at 100 µM	
MATE2K	MDCKII-MATE2K	[^{14}C]Metformin (5 µM)	>100	No inhibition at 100 µM	
MDR1 P-gp	LLC-MDR1	[^{3}H]N-Digoxin (0.1 µM)	>50	No inhibition at 50 µM	[4.2.2.6.20: PK026]
BCRP	Sf9-BCRP	[^{3}H]Methotrexate (10 µM)	>100	No inhibition at 100 µM	[4.2.2.6.19: PK016]
BSEP	Sf9-BSEP	[^{3}H]Taurocholic acid (1 µM)	>100	15% inhibition at 100 µM	

BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; CHO-K1=Chinese hamster ovary-K1; HEK293=human embryonic kidney 293; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; ISL=islatravir; LLC-MDR1=Lilly Laboratories cells expressing multidrug resistance protein 1 (human P-gp); LSC=liquid scintillation counting; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; MDCKII=Madin-Darby canine kidney II; MDR1=multidrug resistance protein 1; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; P-gp=P-glycoprotein; Sf9=Spodoptera frugiperda.

C Confidential

2.6.5.26 ICH M12に基づく M4による薬物トランスポーター阻害の評価

Test Article: ISL Metabolite M4

Summary Results: Risk Assessment for in vivo DDI's between ISL metabolite M4 and co-administered substrates of various transporters based on the ICH M12 guidance (2024)[a]						
Transporter	**$IC_{50,u}$[b](μM)**	**$C_{max,inlet,u}$[c]/$IC_{50,u}$**	**$C_{max,u}$[d]/$IC_{50,u}$**	**(Dose/250mL)[e]/$IC_{50,u}$**	**Threshold Cutoff for Potential DDI**	**Study Number**
OATP1B1	>100	<0.003	-	-	$C_{max,inlet,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	[4.2.2.6.19: PK016]
OATP1B3	>100	<0.003	-	-	$C_{max,inlet,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
OCT1[f]	>100	<0.003	-	-	$C_{max,inlet,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
OCT2	>100	-	<0.0003	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
OAT1	>100	-	<0.0003	-	$C_{,max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
OAT3	>100	-	<0.0003	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.1	
MATE1	>100	-	<0.0003	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.02	
MATE2K	>100	-	<0.0003	-	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.02	
MDR1 P-gp	>50	-	<0.0005	<0.3	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.02 or (Dose/250mL)/$IC_{50,u}$ ≥10 (Based on cutoff values for parent drug)	[4.2.2.6.20: PK026]
BCRP	>100	-	<0.0003	<0.2	$C_{max,u}/IC_{50,u}$ ≥0.02 or (Dose/250mL)/$IC_{50,u}$ ≥10 (Based on cutoff values for parent drug)	[4.2.2.6.19: PK016]

- =not applicable; BCRP=breast cancer resistance protein; $C_{max,inlet,u}$=estimated unbound maximum concentration at liver inlet; C_{max}=observed maximum concentration; $C_{max,u}$=unbound maximum concentration; DDI=drug-drug interaction; F_a=fraction absorbed; F_g=fraction escaping gut metabolism; $f_{u,p}$=unbound fraction in plasma; $IC_{50,u}$=unbound half-maximal inhibitory concentration; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; Dose/250 mL=theoretical maximum gastrointestinal drug concentration calculated as the dose/250mL; ISL=islatravir; k_a=absorption rate constant; MATE1=multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2K=multidrug and toxin extrusion protein 2K; MDR1=multi drug resistance protein 1; MW=molecular weight; OAT1=organic anion transporter 1; OAT3=organic anion transporter 3; OATP1B1=organic anion transporting polypeptide 1B1; OATP1B3=organic anion transporting polypeptide 1B3; OCT1=organic cation transporter 1; OCT2=organic cation transporter 2; P-gp=P-glycoprotein; Q_h=hepatic blood flow; R_B=blood-to-plasma ratio).

[a] ICH M12 Harmonised Guideline Drug Interaction Studies, May 2024.

[b] $IC_{50,u}$ is assumed equivalent to nominal IC_{50}

[c] $C_{max,inlet,u}=f_{u,p}$ x $[C_{max} + (F_a \times F_g \times k_a \times dose)/Q_h/R_B]$ where C_{max}=0.022 μM, R_B=0.6, $f_{u,p}$=0.94, Q_h=1616.7 mL/min and assumes $F_a \times F_g$=1 and k_a=0.1 min^{-1} [Sec. 2.7.2.2].

[d] $C_{max,u}=C_{max} \times f_{u,p}$ where the M4 C_{max}=0.022 μM following a 0.75 mg dose of ISL (MK-8591 P032) [Sec. 2.7.2.2] and $f_{u,p}$=0.94.

[e] (Dose/250 mL) assumes 100% conversion of ISL dose to M4 in the gut=0.75 mg/250 mL=10.23 μM (MW=293.3 g/mol for ISL).

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

C Confidential

2.6.5.27　ISL 及び M4によるヒト CYP 分子種の誘導

2.6.5.27.1　ISL によるヒト CYP1A2の誘導

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002]											
Type of Study	CYP1A2 induction											
Methods	Plated cryopreserved human hepatocytes from 3 donors were incubated with ISL (0.1 to 20 µM), or the PC inducer omeprazole (50 µM) for 48 h											
Analyte	CYP1A2 mRNA and acetaminophen (phenacetin *O*-deethylation)											
Assay	RT-PCR or LC-MS/MS											
Treatment	**Concentration (µM)**	Lot 193				Lot 246				Lot 295			
		hCYP1A2 mRNA		**Phenacetin *O*-Deethylation**		**hCYP1A2 mRNA**		**Phenacetin *O*-Deethylation**		**hCYP1A2 mRNA**		**Phenacetin *O*-Deethylation**	
		Fold[a]	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**
Omeprazole	50	28.5	100.0	13.6	100.0	33.8	100.0	12.4	100.0	17.0	100.0	18.4	100.0
ISL	0.1	0.5	NR	0.9	NR	0.6	NR	0.9	NR	1.1	0.7	0.9	NR
	0.5	0.9	NR	0.8	NR	0.6	NR	0.9	NR	0.6	NR	0.9[c]	NR
	1	0.8	NR	1.1	0.7	1.0	0.0	1.1	0.9	0.7	NR	0.9	NR
	5	0.8	NR	0.9	NR	0.7[c]	NR	1.0	0.0	0.8	NR	0.8	NR
	10	0.6[c]	NR	0.9	NR	1.0[c]	0.1	0.9	NR	2.9	12.0	1.0	0.0
	20	0.4	NR	0.6	NR	0.8	NR	0.9	- 0.6	1.7[c]	4.6	0.7	NR

CYP1A2=cytochrome P450 1A2; DMSO=dimethyl sulfoxide; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA=messenger ribonucleic acid; n=number; NR=not reported (since response was less than DMSO vehicle control); PC=positive control; PCR=polymerase chain reaction; RNA=ribonucleic acid; RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction; v/v=volume/volume.

Note: Commercially available cryopreserved human hepatocytes prepared from 3 single donors were thawed, plated, and cultured for 24 h in culture medium prior to initiation of the study. The hepatocytes were treated for 48 h with vehicle control 0.1% (v/v) DMSO, media, ISL (0.1 to 20 µM), or the PC inducer omeprazole (50 µM) prepared in incubation medium with all solutions being replaced with fresh solutions every 24 h. At the end of the 48 h incubation, whole cell-based CYP1A2 enzyme activity was evaluated by phenacetin *O*-deethylation using LC-MS/MS. The total RNA was isolated for quantitative PCR analysis of CYP1A2 mRNA expression.

[a] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=3).

[b] Percent PC represents the percent of induction relative to omeprazole (50 µM) corrected for DMSO vehicle control.

[c] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=2).

C Confidential

2.6.5.27 ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の誘導（続き）

2.6.5.27.2 ISL によるヒト CYP2B6の誘導

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002]											
Type of Study	CYP2B6 induction											
Methods	Plated cryopreserved human hepatocytes from 3 donors were incubated with ISL (0.1 to 20 µM), or the PC inducer phenobarbital (1000 µM) for 48 h											
Analyte	CYP2B6 mRNA and hydroxybupropion											
Assay	RT-PCR or LC-MS/MS											
Treatment	**Concentration (µM)**	Lot 193				Lot 246				Lot 295			
		hCYP2B6 mRNA		**Bupropion-hydroxylation**		**hCYP2B6 mRNA**		**Bupropion-hydroxylation**		**hCYP2B6 mRNA**		**Bupropion-hydroxylation**	
		Fold[a]	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**
Phenobarbital	1000	20.3	100.0	10.5	100.0	16.5[c]	100.0	6.8	100.0	18.8	100.0	13.6	100.0
ISL	0.1	0.5	NR	0.9	NR	0.4	NR	1.0	0.6	0.6	NR	1.0	NR
	0.5	0.7	NR	0.7	NR	0.4	NR	1.0	NR	0.5	NR	0.8	NR
	1	0.5	NR	1.0	NR	0.8	NR	1.1	1.0	0.7	NR	1.0	0.4
	5	0.6	NR	0.8	NR	0.8	NR	0.9	NR	0.7	NR	1.0	NR
	10	0.4	NR	0.7	NR	1.4	2.4	1.0	NR	1.0	NR	0.9	NR
	20	0.2	NR	0.4	NR	0.7	NR	1.1	2.1	0.7	NR	0.9	NR

CYP2B6=cytochrome P450 2B6; DMSO=dimethyl sulfoxide; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA=messenger ribonucleic acid; n=number; NR=not reported (since response was less than DMSO vehicle control); PC=positive control; PCR=polymerase chain reaction; RNA=ribonucleic acid; RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction; v/v=volume/volume.

Note: Commercially available cryopreserved human hepatocytes prepared from 3 single donors were thawed, plated, and cultured for 24 h in culture medium prior to initiation of the study. The hepatocytes were treated for 48 h with vehicle control 0.1% (v/v) DMSO, media, ISL (0.1 to 20 µM), or the PC inducer phenobarbital (1000 µM) prepared in incubation medium with all solutions being replaced with fresh solutions every 24 h. At the end of the 48 h incubation, whole cell-based CYP3A4 the enzyme activity was evaluated by bupropion hydroxylation using LC-MS/MS. The total RNA was isolated for quantitative PCR analysis of CYP2B6 mRNA expression.

[a] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=3).
[b] Percent PC represents the percent of induction relative to phenobarbital (1000 µM) corrected for DMSO vehicle control.
[c] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=2).

C Confidential

2.6.5.27　ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の誘導（続き）

2.6.5.27.3　ISL によるヒト CYP3A4の誘導

Test Article: ISL

Study Number	[4.2.2.3.5: PK002]											
Type of Study	CYP3A4 induction											
Methods	Plated cryopreserved human hepatocytes from 3 donors were incubated with ISL (0.1 to 20 µM), or the PC inducer rifampicin (10 µM) for 48 h											
Analyte	CYP3A4 mRNA and 6β-hydroxytestosterone											
Assay	RT-PCR or LC-MS/MS											
Treatment	**Concentration (µM)**	Lot 193				Lot 246				Lot 295			
		hCYP3A4 mRNA		**Testosterone 6β-Hydroxylation**		**hCYP3A4 mRNA**		**Testosterone 6β-Hydroxylation**		**hCYP3A4 mRNA**		**Testosterone 6β-Hydroxylation**	
		Fold[a]	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**
Rifampicin	10	10.1	100.0	7.6	100.0	7.1	100.0	7.7	100.0	12.4	100.0	5.4	100.0
ISL	0.1	0.5	NR	0.8	NR	0.4	NR	0.9	NR	0.8	NR	1.0	NR
	0.5	0.8	NR	1.0	NR	0.4	NR	0.9	NR	0.5	NR	0.9	NR
	1	0.7	NR	0.9	NR	0.6	NR	0.9	NR	0.4	NR	0.9	NR
	5	0.4	NR	0.8	NR	0.6	NR	0.8	NR	0.5	NR	0.8	NR
	10	0.5	NR	0.6	NR	0.6	NR	0.7	NR	0.7[c]	NR	0.6	NR
	20	0.1	NR	0.3	NR	0.2	NR	0.5	NR	0.1[c]	NR	0.5	NR

CYP3A4=cytochrome P450 3A4; DMSO=dimethyl sulfoxide; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA=messenger ribonucleic acid; n=number; NR=not reported (since response was less than DMSO vehicle control); PC=positive control; PCR=polymerase chain reaction; RNA=ribonucleic acid; RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction; v/v=volume/volume.

Note: Commercially available cryopreserved human hepatocytes prepared from 3 single donors were thawed, plated, and cultured for 24 h in culture medium prior to initiation of the study. The hepatocytes were treated for 48 h with vehicle control 0.1% (v/v) DMSO, media, ISL (0.1 to 20 µM), or the PC inducer rifampicin (10 µM) prepared in incubation medium with all solutions being replaced with fresh solutions every 24 h. At the end of the 48 h incubation, whole cell-based CYP3A4 the enzyme activity was evaluated by testosterone 6β-hydroxylation using LC-MS/MS. The total RNA was isolated for quantitative PCR analysis of CYP3A4 mRNA expression.

[a] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=3).
[b] Percent PC represents the percent of induction relative to PC rifampin (10 µM) corrected for DMSO vehicle control.
[c] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=2).

Confidential

2.6.5.27　ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の誘導（続き）

2.6.5.27.4　M4によるヒト CYP1A2の誘導

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.21: PK022]												
Type of Study	CYP1A2 induction												
Methods	Plated cryopreserved human hepatocytes from 3 donors were incubated with ISL metabolite M4 (0.1 to 20 µM), or the PC inducer omeprazole (50 µM) for 48 h												
Analyte	CYP1A2 mRNA and acetaminophen (phenacetin *O*-deethylation)												
Assay	RT-PCR or LC-MS/MS												
Treatment	**Concentration (µM)**	Lot 312				Lot 336				Lot 385			
		hCYP1A2 mRNA		**Phenacetin *O*-deethylation**		**hCYP1A2 mRNA**		**Phenacetin *O*-deethylation**		**hCYP1A2 mRNA**		**Phenacetin *O*-deethylation**	
		Fold[a]	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**
Omeprazole	50	30.6	100	17.7	100	49.6	100	13.8	100	38.9	100	18.9	100
M4	0.1	0.8	NR	0.9	NR	1.1	0.1	1.1	1.1	1.1	0.4	1.1	0.4
	0.5	0.8	NR	0.9	NR	0.7	NR	1.2	1.3	1.1	0.2	1.1	0.7
	1	1.7	2.3	0.9	NR	1.0	NR	1.0	0.4	1.1	0.3	1.0	0.3
	5	0.7	NR	0.8	NR	0.9	NR	1.2	1.5	0.9	NR	1.1	0.6
	10	0.9	NR	0.9	NR	0.8	NR	1.2	1.2	0.8	NR	1.1	0.4
	20	0.7	NR	0.9	NR	0.9	NR	1.1	0.7	0.8	NR	1.1	0.3

CYP1A2=cytochrome P450 1A2; DMSO=dimethyl sulfoxide; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA=messenger ribonucleic acid; n=number; NR=not reported (since response was less than DMSO vehicle control); PC=positive control; PCR=polymerase chain reaction; RNA=ribonucleic acid; RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction; v/v=volume/volume.

Note: Commercially available cryopreserved human hepatocytes prepared from 3 single donors were thawed, plated, and cultured for 24 h in plating medium prior to initiation of the study. The hepatocytes were treated for 48 h with vehicle control 0.1% (v/v) DMSO, ISL metabolite M4 (0.1 to 20 µM), or the PC inducer omeprazole (50 µM) prepared in incubation medium with all solutions being replaced with fresh solutions at 24 h. At the end of the 48 h incubation, whole cell-based CYP1A2 enzyme activity was evaluated by phenacetin *O*-deethylation, using LC-MS/MS. The total RNA was isolated for quantitative PCR analysis of CYP1A2 mRNA expression.

[a] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=3).

[b] Percent PC represents the percent of induction relative to PC omeprazole (50 µM) corrected for DMSO vehicle control.

C Confidential

2.6.5.27　ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の誘導（続き）
2.6.5.27.5　M4によるヒト CYP2B6の誘導

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.21: PK022]												
Type of Study	CYP2B6 induction												
Methods	Plated cryopreserved human hepatocytes from 3 donors were incubated with ISL metabolite M4 (0.1 to 20 µM), or the PC inducer phenobarbital (1000 µM) for 48 h												
Analyte	CYP2B6 mRNA and hydroxybupropion												
Assay	RT-PCR or LC-MS/MS												
Treatment	**Concentration (µM)**	Lot 312				Lot 336				Lot 385			
		hCYP2B6 mRNA		**Bupropion hydroxylation**		**hCYP2B6 mRNA**		**Bupropion hydroxylation**		**hCYP2B6 mRNA**		**Bupropion hydroxylation**	
		Fold[a]	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**
Phenobarbital	1000	18.3	100.0	5.7	100.0	13.1	100.0	6.4	100.0	17.5	100.0	10.1	100.0
M4	0.1	0.8	NR	1.1	1.2	0.8	NR	1.3	4.9	0.8	NR	1.1	1.2
	0.5	0.8	NR	1.0	0.5	0.5	NR	1.3	6.2	0.7	NR	1.1	1.2
	1	1.7	3.9	1.0	NR	0.7	NR	1.4	7.9	0.6	NR	1.1	1.3
	5	0.8	NR	1.0	0.3	0.6	NR	1.5	8.5	0.4	NR	1.1	1.3
	10	1.0	NR	1.0	0.5	0.6	NR	1.5	8.8	0.4	NR	1.2	2.2
	20	0.8	NR	1.1	1.6	0.7	NR	1.4	7.8	0.4	NR	1.1	1.4

CYP2B6=cytochrome P450 2B6; DMSO=dimethyl sulfoxide; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA=messenger ribonucleic acid; n=number; NR=not reported (since response was less than DMSO vehicle control); PC=positive control; PCR=polymerase chain reaction; RNA=ribonucleic acid; RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction; v/v=volume/volume.

Note: Commercially available cryopreserved human hepatocytes prepared from 3 single donors were thawed, plated, and cultured for 24 h in plating medium prior to initiation of the study. The hepatocytes were treated for 48 h with vehicle control 0.1% (v/v) DMSO, ISL metabolite M4 (0.1 to 20 µM), or the PC inducer phenobarbital (1000 µM) prepared in incubation medium with all solutions being replaced with fresh solutions at 24 h. At the end of the 48 h incubation, whole cell-based CYP2B6 enzyme activity was evaluated by bupropion hydroxylation using LC-MS/MS. The total RNA was isolated for quantitative PCR analysis of CYP2B6 mRNA expression.

[a] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=3).

[b] Percent PC represents the percent of induction relative to PC phenobarbital (1000 µM) corrected for DMSO vehicle control.

2.6.5.27　ISL 及び M4 によるヒト CYP 分子種の誘導（続き）

2.6.5.27.6　M4によるヒト CYP3A4の誘導

Test Article: ISL Metabolite M4

Study Number	[4.2.2.6.21: PK022]												
Type of Study	CYP3A4 induction												
Methods	Plated cryopreserved human hepatocytes from 3 donors were incubated with ISL metabolite M4 (0.1 to 20 µM), or the PC inducer rifampicin (10 µM) for 48 h												
Analyte	CYP3A4 mRNA and 6β-hydroxytestosterone												
Assay	RT-PCR or LC-MS/MS												
Treatment	**Concentration (µM)**	Lot 312				Lot 336				Lot 385			
		hCYP3A4 mRNA		**Testosterone 6β-Hydroxylation**		**hCYP3A4 mRNA**		**Testosterone 6β-Hydroxylation**		**hCYP3A4 mRNA**		**Testosterone 6β-Hydroxylation**	
		Fold[a]	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**	**Fold[a]**	**% of PC[b]**
Rifampicin	10	31.9[c]	100	10.3	100	66.7	100	19.8	100	45.9	100	34.7	100
M4	0.1	1.0	NR	0.9	NR	1.0	0.0	1.1	0.4	0.9	NR	1.2	0.5
	0.5	1.0	NR	1.1	0.9	0.7	NR	1.1	0.7	0.8	NR	1.2	0.5
	1	2.0	3.4	1.0	0.5	1.0	0.0	1.1	0.6	0.7	NR	1.1	0.4
	5	1.0	0.1	1.1	0.7	0.9	NR	1.2	1.2	0.7	NR	1.2	0.5
	10	1.4	1.3	1.1	0.6	0.8	NR	1.1	0.6	0.6	NR	1.2	0.5
	20	1.0	0.0	1.0[c]	0.3	0.9	NR	1.2	0.9	0.6	NR	1.2	0.6

CYP3A4=cytochrome P450 3A4; DMSO=dimethyl sulfoxide; h=hour(s); ISL=islatravir; LC-MS/MS=liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mRNA=messenger ribonucleic acid; n=number; NR=not reported (since response was less than DMSO vehicle control); PC=positive control; PCR=polymerase chain reaction; RNA=ribonucleic acid; RT-PCR=reverse transcription polymerase chain reaction; v/v=volume/volume.

Note: Commercially available cryopreserved human hepatocytes prepared from 3 single donors were thawed, plated, and cultured for 24 h in plating medium prior to initiation of the study. The hepatocytes were treated for 48 h with vehicle control 0.1% (v/v) DMSO, ISL metabolite M4 (0.1 to 20 µM), or the PC inducer rifampicin (10 µM) prepared in incubation medium with all solutions being replaced with fresh solutions at 24 h. At the end of the 48 h incubation, whole cell-based CYP3A4 the enzyme activity was evaluated by testosterone 6β-hydroxylation using LC-MS/MS. The total RNA was isolated for quantitative PCR analysis of CYP3A4 mRNA expression.

[a] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=3).

[b] Percent PC represents the percent of induction relative to PC rifampin (10 µM) corrected for DMSO vehicle control.

[c] Values represent the mean fold change of treated samples compared to DMSO vehicle control samples (n=2).

C Confidential