TABLE OF CONTENTS

1. まとめ 5
1.1. 分析法 8
2. 吸収 10
2.1. 単回投与後の PK/TK 12
2.2. 反復投与後の PK/TK 12
2.2.1. マウス 12
2.2.1.1. 皮下投与 12
2.2.2. サル 13
2.2.2.1. 皮下投与 13
3. 分布 16
3.1. In silico モデリング 21
3.1.1. アロメトリックスケーリングによるヒト定常状態における肝臓及び腎臓中濃度予測 21
3.1.2. PBPK モデルを用いた血漿、肝臓及び腎臓中濃度の予測 21
3.2. In Vitro 22
3.2.1. 血漿タンパク結合試験 22
3.2.2. 血球移行性 23
3.2.3. トランスポーターの基質となる可能性 23
3.2.4. トランスポーターの阻害剤となる可能性 24
3.3. In Vivo 25
3.3.1. 毒性試験における組織中濃度 25
3.3.1.1. マウス 25
3.3.1.2. サル 29
3.3.2. 胎盤及び乳汁への移行性 30
3.3.2.1. マウス 30
3.3.2.2. ウサギ 31
4. 代謝 35
4.1. In Vitro 38
4.1.1. 肝 S9 画分における代謝 38
4.1.2. CYP1A2、2B6 及び 3A4 の誘導 38
4.1.3. CYP 及びグルクロン酸転移酵素の阻害 40
4.1.4. In silico 40
4.2. In Vivo 41

4.2.1. マウス 41
4.2.1.1. マウス組織における皮下投与後の代謝プロファイル 41
4.2.2. サル 41
4.2.2.1. サル組織における皮下投与後の代謝プロファイル 41
4.2.3. ヒト 43
5. 排泄 45
6. 薬物動態学的薬物相互作用 45
6.1. 被相互作用 45
6.2. 相互作用 45
7. その他の薬物動態試験 46
8. 考察及び結論 47
9. 参考文献 51

2.6.4 及び 2.6.5 の略号等一覧

略号（略称）	英語	日本語
ABC	ATP-Binding Cassette	ATP 結合カセット
ASO	Antisense Oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AUC0-48	Area under the plasma concentration versus time curve (from time 0 to 48 hours)	血漿中濃度-時間曲線下面積（0 時間から 48 時間まで）
AUC0-inf	Area under the plasma concentration versus time curve (from time 0 to time infinity)	血漿中濃度-時間曲線下面積（0 時間から無限大時間まで）
AUClast	Area under the plasma concentration versus time curve (from the time of dosing to the last measurable concentration)	血漿中濃度-時間曲線下面積（投与から最終測定可能時点まで）
AUC0-t	Area under the plasma concentration versus time curve (from time 0 to last time point)	血漿中濃度-時間曲線下面積（0 時間から最終時点まで）
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein	乳がん耐性タンパク質
Cmax	Maximum observed plasma drug concentration	最高血漿中薬物濃度
CL/F	Clearance	クリアランス
CPA	Cyclophosphamide monohydrate	シクロホスファミド一水和物
CYP	Cytochrome P450 Enzymes	シトクロム P450
DDI	Drug-Drug Interaction	薬物相互作用
EC50	Half-Maximal Effective Concentration	50%効果濃度
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
Emax	Maximum Response	最大反応
F or Fabs	Absolute bioavailability	絶対的バイオアベイラビリティ
fu	Unbound Plasma Concentrations Fraction	血漿中非結合型濃度分画
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
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HPLC-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry	HPLC／タンデム質量分析
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection	HPLC／UV 検出
IC50	Half-Maximal Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
IHC	Immunohistochemical Staining	免疫組織化学染色
ISH	In Situ Hybridization	In Situ ハイブリダイゼーション
IP	Intraperitoneal	腹腔内
IV	Intravenous	静脈内
K2EDTA	Dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
K3EDTA	Tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸三カリウム
Km	Michaelis-Menten Constant	ミカエリス・メンテン定数

LC	Liquid Chromatography	液体クロマトグラフィー
MATE	Multidrug and Toxin Extrusion Transporter 1	多剤毒素排出トランスポーター
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cells	Madin-Darby イヌ腎臓細胞
MDR1	Multidrug Resistance Protein 1	多剤耐性タンパク質 1
mRNA	Messenger RNA	メッセンジャーRNA
MRP2	Multidrug Resistance-Associated Protein 2	多剤耐性関連タンパク質 2
MRT	Mean Residence Time	平均滞留時間
MRT0-48	Mean Residence Time (from time 0 to 48 hours)	平均滞留時間（0 時間から 48 時間まで）
NaOH	Sodium Hydroxide	水酸化ナトリウム
Na2HPO4	Disodium Phosphate	リン酸水素二ナトリウム
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OAT	Organic Anion Transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic Cation Transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell	末梢血単核細胞
PBPK	Physiologically Based Pharmacokinetic	生理学的薬物速度論
P-gp	P-Glycoprotein (also known as MDR1)	P 糖タンパク質（別名 MDR1）
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
PPND	Pre- and Post-Natal Development	出生前及び出生後の発生
ROW	Rest of World	その他の地域
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction	リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応
S50	Substrate concentration for allosteric kinetics which supports half the maximum rate of an enzyme-catalyzed reaction	酵素触媒反応が最大反応速度の半分となるアロステリック反応の基質濃度
SC	Subcutaneous	皮下
SLC	Solute Carrier	溶質輸送体
SPE	Solid Phase Extraction	固相抽出法
TK	Toxicokinetic	トキシコキネティクス
Tmax	Time at which Cmax occurred	最高血漿中濃度到達時間
t1/2λz	Terminal Elimination half-life	終末相消失半減期
UDP	Uridine Diphosphate	ウリジン二リン酸
UGT	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase	ウリジン 5’-二リン酸グルクロン酸転移酵素
UHPLC-MS	Ultra High Pressure Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detector	質量分析検出超高圧液体クロマトグラフィー
u	unbound	非結合型
UV	Ultraviolet	紫外線
WT	Wild Type	野生型

1. まとめ

ベピロビルセンの薬物動態について、他の 2′-MOE ASO の公表データを活用して検討した。このクラスの ASO の薬物動態特性は化学構造及び骨格の修飾によって規定されることが報告されている[Geary, 2015]。ベピロビルセンの 5-10-5 ギャップマー構造は海外で承認済みの ASO（inotersen、mipomersen 及び volanesorsen）及び後期臨床試験中の複数の ASO に共通している[Geary, 2015; Geary, 2015; Yu, 2016; Hill, 2023]。また、ベピロビルセンの GalNAc 結合型プロドラッグに関するデータも公表されており、ベピロビルセンの薬物動態特性に関するさらなる洞察が得られている[Han, 2019]。

CD-1 及び CByB6F1 野生型（WT）マウス、NZW ウサギ及びカニクイザルを用いて、ベピロビルセンの吸収、薬物動態（PK）、分布及び代謝について検討した。反復投与毒性試験、遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験で採取した血漿及び組織（肝臓及び腎臓）試料中の非標識ベピロビルセンを測定することにより、反復投与トキシコキネティクス（TK）を評価した。ベピロビルセンは、ヒトでの投与経路として予定されている皮下投与により投与した。また、ベピロビルセンの PK 及びバイオアベイラビリティを評価するため、サル 13 週間試験の負荷投与期間においては静脈内投与も行った。これらの結果に基づき、毒性試験での曝露量評価を実施した。マウス及びサルに最長 2 週間負荷投与し、その後は週 1 回投与する試験を実施した（投与スケジュールについては表 2、表 3 及び表 4 を参照）。負荷投与は、サル 13 週間試験では 4、8 及び 12 mg/kg の用量を 1 時間静脈内持続投与し、それ以外の試験では皮下投与した。

また、ベピロビルセンの血漿タンパク結合、薬物トランスポーターによる輸送又は薬物トランスポーターとの相互作用及び CYP アイソザイムとの相互作用を検討する in vitro 試験を実施した。

すべての試験は、社内各部門の標準作業手順書及び方針を遵守し、GLP の原則に従って実施した。また、OECD 加盟国においては、OECD 試験ガイドラインに従った。主要な反復投与毒性試験は、GLP 規則を完全に遵守して実施した。実験データの品質又は完全性に悪影響を及ぼす事態は発生しなかった。ベピロビルセンを用いて実施したが、本申請資料に含まれていない試験については、APPENDIX 2 に示す。

本項に記載したすべての試験は、ヒトへの投与で使用予定のベピロビルセン（GSK3228836 又は ISIS 505358 としても知られる）のナトリウム塩を用いて実施した。特記しない限り、0.9%塩化ナトリウム水溶液で調製した。本文書中の被験物質並びにその用量及び濃度はすべて、ベピロビルセンとして表記した。以下に要約する非臨床安全性試験で使用した原薬の不純物プロファイルは、臨床使用を予定している製剤の不純物プロファイルと一致していた。

薬物動態試験で得られた重要な結果の概要を以下に示す。2〜7 項では、これらの試験のデザインについて示し、結果について考察する。これらの試験で得られた結果の包括的評価を「8.考察及び結論」に示す。各試験の概要表を 2.6.5 に、報告書を 4.2.2 及び 4.2.3 に示す。各試験の報告書の記載箇所（モジュール 4 番号）及び GLP 適用状況をまとめた一覧表を、表 2、表 4 及び表 9 に示す。

結果の概要

本項では、CD-1 及び CByB6F1 WT マウス、NZW ウサギ並びにカニクイザルを用いて実施したベピロビルセンの吸収、PK、分布及び代謝試験の要約を示し、その結果について考察する。

吸収

- CByB6F1 WT マウスに 13 週間並びにカニクイザルに 13 及び 39 週間反復投与した時のベピロビルセンの吸収及び PK を検討する試験を実施した。
- Cmax は静脈内投与後の方が皮下投与後よりも高く、これは皮下投与後の吸収が遅いために Tmax が遅いことと一致していた。皮下投与後の Tmax は、マウスでは投与後 0.5 時間、サルでは投与後 1～4 時間であった。
- サルにおいて AUC は皮下投与時と静脈内投与時で同程度であり、皮下投与後に完全に吸収されることが示された（皮下投与後の F＞80%）。AUC に性差は認められなかった。
- サルにおいて、皮下投与後の Cmax は用量比をわずかに下回って増加した。AUC0-48 は、単回投与後は用量に比例して増加し、反復投与後には用量比を上回って増加した。

分布

- ベピロビルセンは高い血漿タンパク結合率を示し、マウス、サル及びヒトでそれぞれ 91.6%超、98.3%超、で 94.9%超であった。
- ABC トランスポーター：ベピロビルセンは in vitro で MRP2 を阻害した（IC50：8.49 μM）が、臨床的に影響を及ぼさないと考えられた。また、ベピロビルセンは BCRP 及び P-gp の in vitro 基質又は阻害剤ではなく、MRP2 の in vitro 基質ではなかった。
- SLC トランスポーター：ベピロビルセンは in vitro で MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 トランスポーターを阻害せず、これらのトランスポーターの基質でもなかった。
- 皮下投与後、ベピロビルセンは血漿から組織に速やかに分布した。高濃度に分布したのは肝臓（マウス肝臓では非実質細胞に約 85%、肝細胞に約 15%が分布した）及び腎皮質であった。評価したすべての動物種（マウス、ウサギ、サル）で、腎臓中濃度は用量比を下回って増加したが、肝臓中濃度は概ね用量に比例して増加した。すべての用量において、腎臓での曝露量は雌マウスのほうが雄マウスよりも有意に高かった。
- 検討したすべての動物種の腎臓及び肝臓組織中のベピロビルセン濃度は、13 週間の休薬後に約 96～98%低下した。ただし、マウスで 13 週間の休薬後にベピロビルセンが定量されたのは、13 週及び 26 週間反復投与毒性試験のそれぞれ 100 及び 60 mg/kg/回群の肝臓試料においてのみであり、その他の組織試料中ではすべて定量下限未満であった。
- マウス受胎能及び胚・胎児発生に関する試験では、すべての母動物の肝臓でベピロビルセンが定量可能であり、曝露量は用量に比例して増加した。中及び高用量群では胎盤で

もベピロビルセンが定量された（母動物の肝臓の 6%未満）が、胎児の肝臓では定量下限未満であった。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、母動物の肝臓及び胎盤でベピロビルセンが定量された（胎盤では肝臓の 7%未満）が、胎児の肝臓では定量下限未満であった。以上より、ベピロビルセンは胚・胎児への移行性が低いことが示唆された。

- マウス PPND 試験では、乳汁中及び出生児肝臓中のベピロビルセンの曝露量はごくわずか（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）であったことから、乳汁を介したベピロビルセンの移行性は低いことが示された。

代謝

- ベピロビルセンはエンドヌクレアーゼにより代謝され ASO フラグメントを形成し、更に ASO フラグメントはエキソヌクレアーゼにより代謝及び分解されると考えられる [Yang, 2011; Geary, 2015]。
- マウス及びサルを用いた 13 週間反復投与毒性試験の試験 93 日に採取した肝臓及び腎臓試料中で最も多く検出された ASO はベピロビルセンであり、マウスでは総 ASO 量の 58～84%を占め、サルでは総 ASO 量の 74～90%を占めた（総ピーク面積の割合に基づく）。
- 代謝物 N-1、N-6、N-7、N-8、N-9、N-10、N-11、N-12、N-13、N-14 及び N-15 並びにその他の短鎖化代謝物が総ピーク面積の 10%未満のレベルで検出された。
- 202009 試験から得られた 24 週間ヒト血漿試料の定性的解析により、ベピロビルセン及びこれまでに非臨床動物種で推定されている 8 種類の代謝物が同定された。

排泄

- ベピロビルセンの排泄を評価するための試験は実施していない。

薬物相互作用

- ベピロビルセンは単一ドナー由来の凍結保存ヒト肝細胞において、軽度な CYP3A4 の in vitro 誘導作用を示した。EC50, u 及び Emax はそれぞれ 13.6 μM 及び 2.28 倍であった。
- Bacic 法による静的モデルを用いた検討から、CYP3A4 の in vitro 誘導並びに CYP2C8 及び MRP2 の in vitro 阻害（IC50 はそれぞれ＞100 μM 及び 8.49 μM）は臨床的に重要ではないと予測された。
- 検討した他のすべての酵素及びトランスポーターに対する in vitro での阻害又は誘導は認められなかった。
- 臨床で IL-6 及び IL-10 が誘導される可能性は低く、その結果 CYP 活性が低下する可能性も低いと考えられる（2.6.2.3.1.2）。

その他の PK 試験

- ベピロビルセンのその他の PK 試験は実施していない。

1.1. 分析法

血漿及び組織中のベピロビルセンの定量には、紫外検出 HPLC 法又はタンデム質量分析法（HPLC-UV 又は MS/MS）を用いた。また、サル血漿中のベピロビルセンを測定するための ELISA 法を開発した。HPLC 評価の前に、必要に応じて固相抽出又はタンパク質沈殿を行った。生体試料中のベピロビルセン濃度は、既知濃度のベピロビルセンを添加した試料を分析して作成した検量線を用いて直線回帰により求めた。真度、精度、直線性、定量範囲及び定量限界を求め、各分析法の適合性を確認した。また、分析時に分析法の妥当性を確認するため、コントロール試料を並行して分析した。

ベピロビルセンの定量下限は、血漿試料中では 1 ng/mL～10 ng/mL、肝臓及び腎臓試料中では 50 ng/g～10 µg/g であった。分析法及びバリデーションの要約を APPENDIX 1 に示す。これらの報告書は 4.2.2.1「分析法及びバリデーション報告書」に、ヒト試料を用いて実施した試験の報告書は 5.3.1.4「生物学的及び理化学的分析法検討報告書」に示した。各分析法の濃度範囲及び定量下限を表 1 に示す。

目標濃度 20 µM のベピロビルセンと、マウス、ウサギ、カニクイザル又はヒトの肝 S9 画分を、適切な対照物質とともに最長 24 時間インキュベートした後、UHPLC-MS により代謝物の同定を行った。また、HPLC-UV によりサル及びマウスの肝臓及び腎臓試料中の代謝物を検討した。更に、UHPLC-MS によりヒト血漿中の代謝物を同定した。

PK 及び TK データの解析にはノンコンパートメント法を用いた。

表 1　各マトリックス中でのベピロビルセン定量のためのバリデートされた分析法一覧

Species	Matrix	Assay Type	Assay Range	LLQ
Mouse	Liver homogenate	HPLC-UV HPLC-MS/MS	10 to 1500 µg/g 50 to 50000 ng/g	10 µg/g 50 ng/g
	Kidney homogenate	HPLC-UV HPLC-MS/MS	10 to 1500 µg/g 50 to 50000 ng/g	10 µg/g 50 ng/g
	Plasma (K2EDTA)	HPLC-MS/MS	10 to 10000 ng/mL	10 ng/mL
	Plasma (K2EDTA)	HPLC-MS/MS	10 to 10000 ng/mL	10 ng/mL
	Plasma (K2EDTA)	HPLC-MS/MS	10 to 10000 ng/mL	10 ng/mL
Rabbit	Liver homogenate	HPLC-UV	10 to 1500 µg/g	10 µg/g
Monkey	Plasma (K2EDTA)	ELISA	1 to 160 ng/mL	1 ng/mL
	Plasma (K2EDTA)	ELISA	0.5 to 160 ng/mL	1 ng/mL
	Plasma (K2EDTA)	ELISA	0.5 to 160 ng/mL	1 ng/mL
	Liver homogenate	HPLC-UV	10 to 1500 µg/g	10 µg/g
	Kidney homogenate	HPLC-UV	10 to 1500 µg/g	10 µg/g

Key:
EDTA = Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay
HPLC-UV = High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection
HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry
K2EDTA = Dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid.
LLQ = Lower Limit of Quantitation

2. 吸収

CByB6F1 WT マウスに 13 週間、カニクイザルに 13 及び 39 週間反復投与した時のベピロビルセンの吸収及び PK を検討した。これらの試験の一覧を表 2 に示す。マウス及びサルに最長 2 週間負荷投与を行い、その後週 1 回皮下投与した。サルを用いた 13 週間試験で 4、8 及び 12 mg/kg を 1 時間かけて静脈内投与したのを除き、すべての負荷投与は皮下投与により実施した。主要な毒性試験で皮下投与した時の血漿中ベピロビルセン濃度の動物種間比較を表 10 に示す。毒性試験で得られた反復投与時の TK データの要約を 2.6.5 表 8～表 11 に示す。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

表 2　ベピロビルセンの吸収試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose)	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
13 Week	Mouse (CByB6F1 WT)	18M/18F[f]	SC	0, 4, 12, 40[a]	13 weeks (Days 1 and 91)	Yes	[redacted]	2019N406770 (M71693G)	m4.2.3.2
13 Week[g]	Monkey (cynomolgus)	Up to 7M/7F	IV/SC SC	0, 4, 8, 12[c] 8[d], 40[c]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[e]	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
39 Week[h]	Monkey (cynomolgus)	Up to 7M/7F	SC	0, 3, 6, 10, 20[b]	39 weeks (Days 1 and 273)	Yes[e]	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

Note. All studies were conducted with bepirovirsen sodium the parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise. Studies listed comprise those conducted during the formal research and development of the compound.

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]

Key:
F = Female. IV = Intravenous. M = Male. SC = Subcutaneous. WT = Wild Type.
a = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13).
b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 (Week 3) to Day 273 (Week 39).
c = Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91.
d = Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7
e = Bepirovirsen analysis in tissue and/or plasma samples was conducted using a non-validated method and is therefore not considered to be GLP
f = PK parameters derived from composite sampling with n=3/sex/dose at each timepoint.
g = 13 week repeat dose study with 13-week recovery period.
h = 39 week repeat dose study with 26-week recovery period.

2.1. 単回投与後の PK/TK

ベピロビルセンの PK/TK については、反復投与毒性試験（2.6.6.3）において検討した。ASO は速やかに吸収されることが報告されていること[Geary, 2015]から、ベピロビルセンの単回投与 PK/TK 試験は実施せず、単回投与後の吸収については、カニクイザルを用いた 13 週間反復投与試験で評価した（2019N417078、4.2.3.2）。本試験で得られたベピロビルセンの TK パラメータ（吸収、血漿中濃度）を 2.6.5 表 8 に示す。

2.2. 反復投与後の PK/TK

CByB6F1 WT マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験（2019N406770、4.2.3.2）、並びにカニクイザルを用いた 13 週間（2019N417078、4.2.3.2）及び 39 週間（2019N419364、4.2.3.2）反復投与毒性試験の一環として、血漿中 TK を測定した。また、2'-MOE ホスホロチオエート ASO を静脈内又は皮下投与すると、血漿から組織（特に肝臓及び腎臓）に速やかに分布し、その後、代謝及び切断体の排泄により緩徐に消失することから[Geary, 2015]、毒性試験においてベピロビルセンの組織（腎臓及び肝臓）中濃度を評価し、その結果を 3.3 項に記載した。

全身（血漿）及び組織曝露の比較評価をそれぞれ表 10 及び表 6 に示す。なお、特記しない限り、ベピロビルセンは媒体として 0.9%（w/v）塩化ナトリウム水溶液を用いて調製した。

2.2.1. マウス

2.2.1.1. 皮下投与

13 週間試験

13 週間の不純物安全性確認試験において、雌雄 CByB6F1 WT マウス（主試験用に雌雄各 12 匹、TK 解析用に雌雄各 18 匹）にベピロビルセンを 0（媒体）、4、12 及び 40 mg/kg/回の用量で、試験 1、3、5 及び 7 日に、また、その後試験 91 日までは週 1 回、合計 16 回皮下投与した。試験 1 及び 91 日に採取した血漿試料について、液液抽出法及び LC-MS/MS に基づくバリデートされた分析法を用いて、ベピロビルセン濃度を測定した（2019N406770、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.3）。本試験で得られたベピロビルセンの TK パラメータ（吸収、血漿中濃度）を 2.6.5 表 9 に示す。

試験 1 及び 91 日の投与後 0.5、1、2、4、8 及び 24 時間において、媒体及びベピロビルセン投与群（各群雌雄各 2～3 匹／時点）の血液を K2EDTA 含有採血管に採取し、血漿試料を得た。

4 mg/kg/回群における試験 1 及び 91 日の血漿中ベピロビルセン濃度は、雌では投与後 8 時間まで、雄では投与後最長 24 時間、定量可能であった。12 及び 40 mg/kg/回群では、試験 1 及び 91 日の血漿中ベピロビルセン濃度は、雌雄ともに投与後 24 時間定量可能であった。

試験 1 及び 91 日の Tmax は雌雄とも概して投与後 0.5 時間（最初の検体採取時点）であったが、例外として試験 91 日の 40 mg/kg/回群の雌では投与後 1 時間であった。いずれの用量においても、試験 1 及び 91 日の全身曝露量（Cmax 及び AUC0-t）に顕著な（2 倍超）雌雄

差は認められなかった。したがって、雌雄合算平均値として算出した Cmax 及び AUC0-t を評価に用いた。試験 1 及び 91 日の全身曝露量（雌雄合算平均の Cmax 及び AUC0-t）は、4～40 mg/kg/回まで、用量にほぼ比例して増加した。試験 1 日と試験 91 日の全身曝露量（雌雄合算平均の Cmax 及び AUC0-t）に顕著な差は認められなかった。媒体投与群から採取したすべての試料のベピロビルセン濃度は定量下限（10.0 ng/mL）未満であった。

2.2.2. サル

2.2.2.1. 皮下投与

13 週間試験

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、13 週間反復投与後に 13 週間休薬した時のベピロビルセンの血漿中 TK を検討した。サル（各群雌雄 3 匹）にベピロビルセン 0（媒体）、4、8 及び 12 mg/kg/回を試験 1、3 及び 5 日に静脈内負荷投与した後、試験 7 日から試験 91 日までは週 1 回の頻度で皮下投与した（第 1～4 群）。別の群のサルにはベピロビルセン 40 mg/kg/回を試験 1、3 及び 5 日に皮下投与した後、試験 7 日から試験 91 日までは週 1 回の頻度で皮下投与した（第 5 群）。回復性及び TK 評価のために、各用量群に追加の動物を割り付けた（回復性評価用に第 1、4 及び 5 群に雌雄各 2 匹を追加し、TK 評価用に第 6 群を追加した）（2.6.6.3.3.1.1）（2019N417078、4.2.3.2）。試験デザインの概要を表 3 に示す。本試験で得られたベピロビルセンの TK パラメータを 2.6.5 表 8 及び 2.6.5 表 10 に示す。

血漿試料中のベピロビルセン濃度は、バリデートされたハイブリダイゼーション ELISA 法を用いて測定した。ただし媒体群から得られた血液試料の血漿分析は実施しなかった。

表 3 サル 13 週間試験（休薬 13 週間）の試験デザイン

Group	n/sex/group	Route		Dose (mg/kg/dose)
		Loading dose (Day 1, Day 3 and Day 5)	Weekly Dosing (Days 7 to 91)	
1	3+2[R]	IV	SC	0 (Vehicle)
2	3			4
3	3			8
4	3+2[R]			12
5	3+2[R]	SC		40
6	7[a]	SC	8 mg/kg dosed on Day 1, Day3, Day 5 and Day 7	

Key:
a = 1 animal/sex necropsied on Day 3 (predose), Day 9, Day 16, Day 23, Day 30, Day 44 and Day 58
R = Recovery group animals

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

ベピロビルセンを投与したすべてのサル（第 2～6 群）では、単回投与（1 時間静脈内投与又は皮下投与）後及び反復皮下投与後のいずれにおいても、ベピロビルセンの血漿中曝露が認められた。全身曝露量に明らかな又は一貫した性差は認められなかった。

第 2～4 群でベピロビルセンを静脈内投与した時の Tmax の中央値は、試験 1 日の投与終了時（1 時間）であった。ベピロビルセンを単回及び反復皮下投与した時の Tmax の中央値は、すべての用量群及び試験日で 1.0～4.0 時間であった。第 5 及び 6 群の Tmax は、単回皮下投与後と反復皮下投与後で同程度であった。

第 6 群の試験 1 日の AUC0-48 は、試験 7 日（ベピロビルセン 8 mg/kg を 4 回皮下投与後）の AUC0-48 及び主試験動物（第 3 群）の試験 91 日（ベピロビルセン 8 mg/kg を 16 回皮下投与後）の AUC0-48 と同程度であった。

第 5 群の血漿中トラフ濃度は試験 14 日以降一定であり、ほぼ定常状態に達したことが示された。第 2～4 群の血漿中トラフ濃度は投与後 2 ヵ月（試験 48～60 日）に上昇傾向が認められ、個体間変動が増加した。また、投与期間を通じてトラフ濃度に用量依存性が認められた。

第 2 群と第 4 群では、試験 1 日の静脈内投与後の Cmax 及び AUC0-48 は概ね用量に比例し、用量が 3 倍増加するとそれぞれ 2.9 倍及び 3.2 倍増加した。第 5 群と第 6 群の試験 1 日における単回皮下投与を比較すると、5 倍の用量増加に伴う Cmax の増加は 3.0 倍と用量比をわずかに下回り、AUC0-48 の増加は 6.1 倍と概ね用量に比例した。また、第 2 群と第 5 群の試験 91 日の反復皮下投与を比較すると、10 倍の用量増加に伴う Cmax の増加は 5.4 倍と用量比を下回り、AUC0-48 の増加は 22 倍と用量比を上回った。

静脈内及び皮下投与後、ベピロビルセンの血漿中濃度は速やかに低下した。

投与後 48 時間以内の血漿から組織へのベピロビルセンの初期の急速かつほぼ完全な分布を反映する指標として、投与初日（試験 1 日）、4 回目（試験 7 日）及び 16 回目（試験 91 日）の投与後の MRT0-48 を算出した。静脈内投与後の MRT0-48 は 1.62～1.74 時間、皮下投与後では 4.85～11.1 時間の範囲であった。すべての用量及び投与経路において、ベピロビルセンの血漿中動態は多相性を示し、このことは血漿から組織へのベピロビルセンの分布が比較的速やかであることを示唆している。

静脈内投与後のベピロビルセンのクリアランスは、すべての用量で 48.9～61.3 mL/hr/kg の範囲であり、用量に依存しなかった。皮下投与後のベピロビルセンのクリアランスは、単回又は反復投与のいずれにおいてもすべての用量で 41.1～64.5 mL/hr/kg の範囲であり、用量に依存しないと考えられた。第 6 群のベピロビルセンの血漿中見かけの t1/2λz は 10.6 日であった。第 4 群及び第 5 群ではそれぞれ 43 日及び 22 日であったが、動物数が限られているため、解釈には注意が必要である。試験 1 日の第 3 群と第 6 群の血漿中曝露量（AUC0-48）に基づくと、試験 1 日に皮下投与した時の Fabs は 80%を超えており、皮下投与経路によるほぼ完全な全身吸収が示唆された。

負荷投与（試験 1、3 及び 5 日）の投与後から投与終了時（試験 91 日）まで、用量依存的なトラフ濃度をモニタリングした。第 5 群の血漿中トラフ濃度（前回投与から 7 日後）は、試験 14 日以降、ほぼ一定の値を示し、負荷投与期間終了時までにほぼ定常状態に達したこ

とが示された。第 2～4 群のトラフ濃度は、試験 63 日まで上昇し、その後（試験 77～91 日）は概ね一定の値を示した。

39 週間試験

カニクイザルにベピロビルセンを 39 週間投与し、その後 26 週間休薬した時の血漿中ベピロビルセンの TK を検討した。ベピロビルセンを 0（媒体）、3、6、10 及び 20 mg/kg/回の用量で試験 1、5、10 及び 14 日に投与し、その後試験 21 日から 39 週まで週 1 回皮下投与した（各群雌雄各 4～5 匹、回復性評価用に 10 及び 20 mg/kg/回群に雌雄各 2 匹を追加）（2.6.6 3.3.1.2）（2019N419364、4.2.3.2）。本試験で得られたベピロビルセンの TK パラメータ（吸収、血漿中濃度）を 2.6.5 表 11 に示した。

試験 1 及び 273 日の投与前、投与後 1、2、4、6、10、24 及び 48 時間に血液を K2EDTA 含有チューブに採取し、ベピロビルセン分析用に血漿を採取した。試験 10、14、42、98、147、182 及び 217 日の投与前、並びに休薬期間中（10 及び 20 mg/kg/回群）の試験 280、287、294、301、322、329、343、385 及び 455 日に血漿を採取した。バリデーション済みのハイブリダイゼーション ELISA 法を用いて、ベピロビルセン投与群から採取した血漿試料及び媒体投与群から採取した一部の試料中のベピロビルセン濃度を測定した。

ベピロビルセンの血漿中濃度は概ね、皮下投与後 2 時間以内に最高値に達した。すべての用量群の試験 1 日及び 273 日の Tmax の中央値は投与後 2～4 時間の範囲であり、試験 273 日では高用量で Tmax に遅延傾向が認められた。

Cmax は概ね用量に比例して増加したが、AUClast は概ね用量比を上回って増加した。反復投与後の Cmax（試験 273 日）は試験 1 日と概ね一致していたが、AUClast（試験 273 日）は試験 1 日よりも概ね高かった。

試験 273 日の最終皮下投与後も休薬期間（182 日間）を通して、ベピロビルセンは血漿中に検出された。概して、投与前のトラフ血漿中濃度も用量依存的に増加した。トラフ濃度は試験 93 日以降に定常状態に達すると考えられたが、例外として高用量群の雄のトラフ濃度は上昇し続けると考えられた。

3. 分布

マウス、サル及びヒト血漿におけるベピロビルセンの血漿タンパク結合を検討するため、一連の in vitro 試験を実施した。また、一連の in vitro 試験において、ベピロビルセンの P-gp、BCRP、MRP、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 の輸送及び／又は阻害について評価した。

反復投与毒性試験において、マウスに 13 及び 26 週間、カニクイザルに 13 及び 39 週間、ベピロビルセンを投与し、腎臓及び肝臓でのベピロビルセンの組織分布を検討した。

カニクイザルの組織中濃度データを用いて、アロメトリックスケーリングによりヒトの定常状態における肝臓及び腎臓中濃度を予測した。また、ヒト肝臓におけるベピロビルセンの分布に関する in-silico PBPK モデルを構築した。

胎盤通過性については、マウス及びウサギを用いた生殖発生毒性試験で評価した。

実施した試験の一覧を、本申請資料のモジュール 4 に含まれる報告書の所在及びそれらの GLP 適用状況とともに表 4 に示す。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

表 4　ベピロビルセンの分布試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Predicted human steady state liver and kidney concentrations	Human in silico	NA	In silico	NA	NA	No	GSK	2020N447096	m4.2.2.3
PBPK modelling for plasma and tissues concentration-time profiles	Human in silico	NA	In silico	NA	NA	No	GSK	2024N562088	m4.2.2.3
Plasma protein binding	Mouse, monkey and human plasma	NA	In vitro	5, 150 µg/mL	NA	No	Ionis	2019N419183 (505358-IS03)	m4.2.2.3
Inhibitor and Substrate of BCRP, P-gp, MRP, MATE, and OAT, OCT, OATP	Human	NA	In vitro	Inhibition Assay: 0.046 to 100 µM 0.023 to 50.0 µM for OAT1 and OCT1 Substrate Assay 0.100, 1.00 and 10.0 µM	NA	No	[redacted]	2022N522434	m4.2.2.3
Distribution (liver)	Mouse (CD-1)	3M/3F[DRF] 12M/12F	SC	0, 500 to 2000	Single (24 and 48 hours)	Yes	[redacted]	2019N419174	m4.2.3.3.2

表 4　ベピロビルセンの分布試験一覧（続き）

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Distribution (Liver, kidney)	Mouse (CD-1)	11M+3M[TK]	SC	0, 40	4-weeks	No	GSK	2023N535316 (M73070N)	m4.2.3.2
Distribution (Liver, kidney and Placenta)[l]	Mouse (CD-1)	6M/6F	SC	0, 3, 15, 25	10 weeks (Day 71/male liver, GD 18/fetal and maternal liver, placenta)	Yes[h]	[redacted]	2017N337889 (505358-AS07)	m4.2.3.5.1
Distribution (Liver and kidney)[i]	Mouse (CD-1)	10M/10F +6M/6F[R]	SC	0, 4, 12, 40, 100[a]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[f,g]	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
Distribution (Liver and kidney)[i]	Mouse (CBy86F1 WT)	12M/12F +18M/18F[TK]	SC	0, 4, 12, 40[a]	13 weeks (Day 91)	Yes	[redacted]	2019N406770 (M71693G)	m4.2.3.2
Spatial Distribution (Liver and Kidney)[z]	Mouse (CD1)	6M/6F[TK]	SC	0, 12	13 Week	No	GSK	2021N494839 (X72475N)	m4.2.2.3
Distribution (Liver and kidney)[k]	Mouse (CD-1)	12M/12F+6M/ 6F[R]	SC	0, 3, 10, 30, 60[b]	26 weeks (Day 184)	Yes[f]	[redacted]	2019N419097 (505358-AS06)	m4.2.3.2
PPND	Mouse (CD-1)	24F+6F[TK]	SC	0, 3, 15, 25	GD 6 up to LD 21 (LDs 10 and 21)	Yes	[redacted]	2023N530614 (9002027)	m4.2.3.5.3
2-year (104 weeks) carcinogenicity	Mouse (CD-1)	70M/F+6M/F tissue analysis	SC	0, 3, 10, 30	104 weeks[#]	Yes	[redacted]	2021N489170 (8003091)	m4.2.3.4.1

表 4　ベピロビルセンの分布試験一覧（続き）

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Distribution (Placenta, maternal and fetal liver)[m]	Rabbit (NZW)	3F	SC	0, 6, 12.6, 25.2[c]	13 days (GDs 20 and 28)[c]	Yes[i]	[redacted]	2017N337736 (505358-AS08)	m4.2.3.5.2
Distribution (Liver and kidney)[n]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F+ 2M/2F[R] 3M/3F+2M/2F[R] 7M/7F[TK]	IV/SC SC SC	0, 4, 8, 12[d] 0, 40[d] 8[q]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
Distribution (Liver and kidney)[o]	Monkey (cynomolgus)	4M/4F 7M/7F	SC	0, 3, 6, 10, 20[b]	39 weeks (Days 86, 113, 240 241, 258, 275, 354, 455)	Yes[i]	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

表 4　ベピロビルセンの分布試験一覧（続き）

Note: Bepirovirsen sodium the parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) has been used in all studies unless otherwise noted. **Key:** BCRP = breast cancer resistance protein. DRF = Dose Range Finding. GD = Gestation Day. IV: Intravenous. LD: Lactation Day. MRP: multidrug resistance associated protein. MATE: Multidrug and Toxin Extrusion Transporter. NA = Not applicable; NZW = New Zealand White. OAT: organic anion transporter. OCT1: organic cations transporter. P-gp: P-glycoprotein multidrug transporter. R = Recovery; SC = Subcutaneous. TK = Toxicokinetic. WT = Wild Type. a = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13). b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 (Week 3) to Day 273 (Week 39). c = Animals dosed on Gestation Day (GD) 6, GD 8, GD 10, GD 12, GD 14, GD 16 and GD 18. d =Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91. e =Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7. f = The analysis of bepirovirsen in kidney samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. g = The evaluation of samples from the 100 mg/kg group for the presence of metabolites was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. h = The analysis of bepirovirsen in placentae samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. i = Bepirovirsen analysis in tissue and/or plasma samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. j = Samples from a 13-week toxicology study in mice. k = Samples from a 26-week toxicology study in mice. l = Samples from a mouse combined fertility and development study. m = Samples from a rabbit embryofetal development study. n = Samples from a 13-week toxicology study in monkeys. o – Samples from a 39 week toxicology study in monkeys. Q - Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7. z = Details of the in-life phase are included in Study Number 20317070 (GSK Report 2021N488385). Data from GSK Report 2021N488385 was used to model. # = SC injection/ once a day on Days 1, 4, 8, and 11 then once weekly starting Day 15.	**Testing Facility:** [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted] [redacted] GSK = GSK [redacted] = [redacted] [redacted] Ionis = Ionis Pharmaceuticals, Inc. (formerly known as ISIS Pharmaceuticals) [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted]

3.1. In silico モデリング

3.1.1. アロメトリックスケーリングによるヒト定常状態における肝臓及び腎臓中濃度予測

ヒトにベピロビルセン 150 mg 及び 300 mg を投与した時の肝臓及び腎臓中ベピロビルセン濃度を、カニクイザルのデータからアロメトリックスケーリング法[Geary, 2015]を用いて推定した。推定に際しては、Gastroplus（version 9.7）の既定の臓器パラメータを用いて、薬物動態が線形であると仮定し、サルとヒトの肝臓及び腎臓の体積補正を行った（2020N447096、4.2.2.3）。本試験で得られたデータの要約を 2.6.5 表 12 に示す。

150 及び 300 mg を投与した時の推定ヒト肝臓中濃度は、それぞれ 128 及び 256 µg/g tissue であった。150 及び 300 mg を投与した時の推定ヒト腎臓中濃度は、それぞれ 129 及び 259 µg/g tissue であった。

3.1.2. PBPK モデルを用いた血漿、肝臓及び腎臓中濃度の予測

300 mg の単回投与データを用いてベピロビルセンの PBPK モデルを構築し、ヒトにベピロビルセンを 75、150、300 及び 450 mg の用量で投与した時の血漿中 PK 及び組織中濃度を予測するために検証した（2024N562088、4.2.2.3）。PBPK モデルの検証には、健康被験者の単回及び反復皮下投与データを用いた。サルで得られた肝及び腎分配係数比（サルの血漿中非結合型濃度分率（fu）=0.0058 及びヒト fu=0.0099 で補正）を用いて、ヒトの肝臓及び腎臓中ベピロビルセン濃度を予測した。このモデルを用いて、血漿中消失半減期の予測及び検証、並びに肝臓細胞（肝細胞及び内皮細胞を除く非肝細胞）半減期を予測した。本試験で得られたデータの要約を 2.6.5 表 13 に示す。データ解析、モデリング及びシミュレーションに使用したソフトウェアパッケージは Simcyp v24.0（Certara, Sheffield, UK）及び Phenix（8.3.5.340）であった。

ヒトにおける肝臓及び腎臓の分配係数はそれぞれ 2147 及び 2955 と算出された。300 mg を単回投与した時のクリアランス（L/h）、AUC0-inf（µg.h/mL）及び Cmax（µg/mL）の実測値（B-Assured 試験の健康被験者群）はそれぞれ 2.94、114.43 及び 10.56 であったのに対し、予測値は 2.25、123.51 及び 7.85 であった。観察されたこれらの臨床血漿中濃度-時間プロファイルは、予測値の 5〜95 パーセンタイルの範囲内であった。その後、このモデルを用いて、中等度肝機能障害患者を対象とした第 2 相臨床データ（Sim-Hepatic impairment Child Pugh B を使用）並びに B-Assured 試験及び CS3 試験から得られた B 型肝炎ウイルス（HBV）持続感染患者を対象とした第 3 相臨床データ（sim-Healthy 被験者を使用）をそれぞれ予測し、実測値と比較した。中等度肝機能障害患者に 300 mg を単回投与した時のクリアランス（L/h）、AUC0-inf（µg.h/mL）及び Cmax（µg/mL）の予測値はそれぞれ 2.72、115.43 及び 7.11 であったのに対し、実測値は 4.19、78.72 及び 7.60 であった。結果の要約を表 5 に示す。

表 5 血漿中 PK パラメータの予測値と実測値の比較

Dose (study)	Mean Observed Plasma AUC0-inf (µg.h/ml)	Mean Predicted Plasma AUC0-inf (µg.h/ml)	Mean Observed Plasma Cmax (µg/ml)	Mean Predicted Plasma Cmax (µg/ml)	Mean Observed Plasma clearance (L/h)	Mean Predicted Plasma clearance (L/h)
Single dose 300 mg (B-Assured, healthy participants,)	114.43	123.51	10.56	7.85	2.94	2.25
Single dose 300 mg (B-Assured and CS3 studies, moderate hepatic impairment)	78.72	115.43	7.60	7.11	4.19	2.72

300 mg を反復皮下投与した時の試験 22 日における血漿中ベピロビルセンの消失半減期の予測値と実測値は、27.77±11.4 日に対して 24±8.56 日であった。肝臓細胞における消失半減期は 37 日と予測された。この半減期は肝臓細胞での半減期を表すものであるが、肝細胞は肝臓の容積の 70～80%を占め、非肝細胞は約 6%であることが知られているため、この半減期は肝細胞での半減期を表していると考えられる[Bogdanos, 2013]。

メカニズムに基づく本 PBPK モデルはオリゴヌクレオチドの組織分布予測にも適していると考えられ、ベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度についても予測した。その結果、ベピロビルセン 300 mg を反復投与した時の Cmax の平均値（5～95 パーセンタイル）は、肝臓で 172（117～237）µg/mL、腎臓で 132（88～198）µg/mL と予測された。

3.2. In Vitro

3.2.1. 血漿タンパク結合試験

3 種類の動物種（ヒト、カニクイザル及びマウス）の血漿を用いて、ベピロビルセンの血漿タンパク結合率を 2 濃度（5 及び 150 µg/mL）で評価した（2019N419183、4.2.2.3）。

限外ろ過法とヌクレアーゼ依存的ハイブリダイゼーション ELISA 検出法を組み合わせて、ベピロビルセンの血漿タンパク結合率を in vitro で評価した。健康被験者、カニクイザル及び CD-1 マウスの全血漿（K3-EDTA を用いて採取）からプールした凍結血漿を、本試験用に購入した。ベピロビルセンを添加した各血漿試料（300 µL）をプレコンディショニングしたフィルターユニットに入れ、37℃で 30 分間インキュベートしてオリゴヌクレオチドと血漿タンパク質を結合させた。インキュベーション後すぐにフィルターを 2000 g で 16 分間遠心分離し、最初の血漿量の約 15～20%（約 45～60 µL）のろ過液を回収した。限外ろ過液（タンパク質未結合のベピロビルセンを含む）及び未処理の血漿サンプル（タンパク質結合及び未結合のベピロビルセンを含む）をヌクレアーゼ依存的ハイブリダイゼーション ELISA 法（バリデーション未実施）により測定し、各サンプル中のベピロビルセン濃度を求

めた。この非競合的イムノアッセイでは、まず、3'末端に bioTEG、5'末端にジゴキシゲニン（検出プローブ）を含むベピロビルセンの相補的配列を用いて血漿中のベピロビルセンとハイブリダイズさせ、ハイブリダイズ複合体をニュートラアビジンコーティングプレートに固定させた。続いて、S1 ヌクレアーゼをプレートに添加して 21℃で約 2 時間インキュベートすることにより、ハイブリダイズしていない検出プローブを切断した。その後、アルカリホスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体を添加し、プレートに結合したハイブリダイズ複合体と反応させた。このアルカリホスファターゼは、*AttoPhos*（Promega, Madison, Wisconsin）から蛍光生成物への変換を触媒する。その後、15% Na2HPO4 を添加して反応を停止し、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。各濃度につき 3 回の反復測定を行い、血漿タンパク非結合率の平均値及び標準偏差を求めた。本試験で得られたデータの要約を 2.6.5 表 23 に示す。

ベピロビルセンの高い血漿タンパク結合はこのクラスの他の ASO 分子と同様に親水性相互作用によるものであり、親和性が低く、非特異的であると考えられる。ベピロビルセンの血漿タンパク結合率はマウスで 91.6%超、サルで 98.3%超、ヒトで 94.9%超であった。

3.2.2. 血球移行性

ベピロビルセンの血球移行性を評価した試験は実施していない。

3.2.3. トランスポーターの基質となる可能性

ベピロビルセンの双方向輸送について、コントロール、MDCKII-BCRP 及び Abcb1KO-MDCKII-MDR1 細胞単層膜を最長 120 分間インキュベートして検討した。試験デザインには、細胞生存率及び培地中濃度の評価も含めた（2022N522434、4.2.2.3）。本試験で得られたデータの要約を 2.6.5 表 27 に示す。

ベピロビルセン（10 及び 100 μM）を適切に頂端部又は側底部に添加した。被験物質及び対照物質の初期濃度及び回収率を測定するため、インキュベーション前にヘルパープレートから、インキュベーション後にドナーチャンバーから試料を採取した。インキュベーション後、レシーバーチャンバーから試料を採取し、移動したベピロビルセン及び対照物質の量を測定した。試料は LC-MS/MS を用いて分析した。

陽性対照基質として、プラゾシン（1 μM）及びジゴキシン（1 μM）を使用した。

その結果、ベピロビルセンは、排出トランスポーターである P-gp 又は BCRP を発現する細胞の単層膜において、A→B 方向及び B→A 方向の透過性は低かったため、信頼性が高く意味のある排出比を求めることはできなかった。

ベピロビルセンが MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 トランスポーターの基質となる可能性を検討する in vitro 試験を実施した。MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 又は OCT2 を発現させたヒト HEK293 細胞とベピロビルセンをインキュベートした。試験デザインには、細胞生存率及び培地中濃度評価も含めた（2022N522434、4.2.2.3）。本試験で得られたデータの要約を 2.6.5 表 27 に示す。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

トランスポーター特異的阻害剤の存在下及び非存在下、各細胞をベピロビルセン（0.100、1.00 及び 10.0 μM）を含むそれぞれの適切なアッセイバッファーを用いて 2 及び 20 分間インキュベートした。インキュベーション後、氷冷したバッファーで細胞を洗浄して反応を停止した。細胞をメタノール：バッファー混合液（2：1）で溶解し、質量分析法により細胞中のベピロビルセンの蓄積性を検討した。

陽性対照基質として、MATE1、MATE2-K 及び OCT2 にはメトホルミン（10 μM）、OCT1 にはスマトリプタン（10 μM）、OAT1 にはテノホビル（5 μM）、OAT3 には E3S（1 μM）、OATP1B1 には E217βG（1 μM）、OATP1B3 には CCK-8（1 μM）を用いた。

その結果、検討した試験条件下においてベピロビルセンは MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 トランスポーター発現細胞の in vitro 基質ではないことが示された。

ヒト ABC（排出）トランスポーターMRP2 を過剰発現させた細胞から調製した inside-out 膜小胞を用いて、ベピロビルセンが MRP2 の基質であるか否かを検討する in vitro 試験を実施した。試験デザインには、回収率及び培地中濃度評価も含めた（2022N522434、4.2.2.3）。本試験から得られたデータの要約表を 2.6.5 表 27 に示す。

ATP 又は AMP の存在下（トランスポーターの阻害剤の存在下又は非存在下）で、ベピロビルセン（名目濃度 1.00 及び 10.0 μM）を含む各アッセイバッファー中で膜小胞を 10 分間インキュベートした。溶液に ATP 又は AMP を添加して反応を開始し、インキュベート後、氷冷洗浄バッファー200 μL を添加して反応を停止し、直ちにろ過した。フィルターを洗浄、乾燥後、ろ過した膜小胞内のベピロビルセン量を LC-MS/MS により測定した。

陽性対照基質として E217βG（100 μM）を用いた。その結果、ベピロビルセンは MRP2 の in vitro 基質ではなかった。

結論として、ベピロビルセンは、検討した試験条件下において、MRP2、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 トランスポーターの in vitro 基質ではなく、P-gp 及び BCRP の in vitro 基質でもないと考えられた。

3.2.4. トランスポーターの阻害剤となる可能性

各ヒト ABC（排出）トランスポーターを過剰発現させた細胞から調製した inside-out 膜小胞を用いて、ベピロビルセンの P-gp、BCRP 及び MRP2 に対する阻害作用を検討する in vitro 試験を実施した。試験デザインには、回収率及び培地濃度評価も含めた（2022N522434、4.2.2.3）。本試験から得られたデータの要約表を 2.6.5 表 27 に示す。

ベピロビルセン（0.046～100 μM）存在下で、プローブ基質を含む各アッセイバッファー中で膜小胞をインキュベートした。溶液に ATP 又は AMP を添加して反応を開始し、インキュベート後、氷冷洗浄バッファー200 μL を添加して反応を停止し、直ちにろ過した。フィルターを洗浄、乾燥し、ろ過した膜小胞内の基質量を液体シンチレーション計測により測定した。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

陽性対照基質として P-gp には NMQ（N-methyl quinidine）（1 μM）、BCRP には E3S（1 μM）、MRP2 には E217βG（100 μM）を用いた。

その結果、ベピロビルセンは in vitro で MRP2 を介した E217βG の蓄積を阻害したが（IC50：8.49 μM）、p-gp 及び BCRP を阻害しなかった。

ベピロビルセンの MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 トランスポーターに対する阻害作用を検討するため、in vitro 試験を実施した。MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 を発現させたヒト HEK293 細胞とベピロビルセンをインキュベートした。試験デザインには、細胞生存率及び培地濃度評価も含めた（2022N522434、4.2.2.3）。本試験から得られたデータの要約を 2.6.5 表 27 に示す。

ベピロビルセン（MATE1、MATE2-K、OAT3、OATP1B1、OATP1B3 及び OCT2 では 0.046～100 μM、OAT1 及び OCT1 では 0.023～50.0 μM）存在下、評価するトランスポーターごとに適切なバッファー中で細胞を 30 分間プレインキュベーションした。プローブ基質をベピロビルセン溶液に添加し、インキュベート後に氷冷バッファーで細胞を洗浄して反応を停止させた。細胞を 0.1 M NaOH 溶液で溶解し、細胞内のプローブ基質の蓄積を液体シンチレーション計測により測定した。

陽性対照基質として、MATE1、MATE2-K 及び OCT2 にはメトホルミン（10 μM）、OCT1 にはスマトリプタン（10 μM）、OAT1 にはテノホビル（5 μM）、OAT3 には E3S（1 μM）、OATP1B1 には E217βG（1 μM）、OATP1B3 には CCK-8（1 μM）を用いた。

その結果、ベピロビルセンは、検討した試験条件下で、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 トランスポーター発現細胞に対する in vitro 阻害作用を示さなかった。

結論として、検討した試験条件下では、ベピロビルセンは MRP2 を介した E217βG の蓄積を阻害したが（IC50:：8.49 μM）、P-gp、BCRP、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 に対する in vitro 阻害作用は示さなかった。

3.3. In Vivo

ベピロビルセンの組織分布は、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験で得られた組織試料を用いて評価した（2.6.6.3～2.6.6.6）。なお、特記しない限り、ベピロビルセンは媒体として 0.9%（w/v）塩化ナトリウム水溶液を用いて調製した。

3.3.1. 毒性試験における組織中濃度

3.3.1.1. マウス

単回投与試験

CD-1 マウスを用いた非 GLP 哺乳類小核試験の一環として、ベピロビルセンを 0（媒体）、500、1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回皮下投与した（各群雌雄各 12 匹）。CPA

70 mg/kg の IP 投与を陽性対照とした（雌雄各 6 匹）（2019N419174、4.2.3.3.2）（2.6.6.4.3.1）。この試験で得られたベピロビルセンの肝臓中濃度を 2.6.5 表 14 に示す。

計 48 例のマウス肝臓試料（媒体群から 12 検体、500、1000 及び 2000 mg/kg 群から 36 検体）を採取し、バリデートされていない HPLC-UV 法を用いてベピロビルセン濃度を測定した。ISIS 355868 を内部標準として 10～1500 µg/g の濃度範囲で直線回帰により濃度を算出した。

ベピロビルセンの肝臓中濃度は、雌雄マウスのいずれにおいても用量に依存し、ほぼ用量に比例した。投与後 24 及び 48 時間の肝臓中ベピロビルセン濃度は、それぞれ 276.4～504.4 µg/g 及び 297.1～579.1 µg/g であった。肝臓中ベピロビルセン濃度に明らかな性差は認められなかった。

CD-1 マウスに 40、100 及び 300 mg/kg（各群 6 匹）を単回皮下投与した神経行動学的試験の一環として、投与後 24 時間の肝臓試料を HPLC で分析した。高用量群（300 mg/kg）の肝臓中濃度は 319.15 µg/g であった（2019N419057、4.2.1.3）（2.6.2.4.1）。

反復投与

4 週間試験

新規合成経路の評価において、ベピロビルセンを対照薬として使用した。雄 CD-1 マウス（各群 11 匹、TK 評価用に各群 3 匹を追加）にベピロビルセンを 0（媒体）及び 40 mg/kg/回の用量で 4 週間（試験 1、3、5、7、14、21 及び 28 日）皮下投与した（2023N535316、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.1）。

試験 30 日に肝臓及び腎臓組織を採取し、ベピロビルセン濃度を測定した。その結果、肝臓及び腎臓中濃度はそれぞれ 217 µg/g 及び 126 µg/g であり、雄マウスに 40 mg/kg を投与した他の試験と同様であった（2.6.5 表 15）。

13 週間不純物安全性試験：肝臓及び腎臓での分布

CD-1 マウスを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験（2021N488385、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.4）における媒体群及び 12 mg/kg 群の動物から試験 92 日に採取した組織検体を用いて、肝臓及び腎臓におけるベピロビルセンの組織分布を、IHC を併用した無標識 ISH 法により評価した（2021N494839、4.2.2.3）。本試験で得られたデータの要約を 2.6.5 表 16 に示す。

肝臓における空間分布解析から、ベピロビルセンの約 85%が非実質細胞集団（クッパー細胞、星細胞及び肝内皮類洞内）に分布していることが示唆された。残りの約 15%は肝細胞で検出され、エンドソーム分布を示唆する大きな点状染色パターンを概ね示した。また、肝門脈、肝動脈及び胆管から構成される肝門脈三枝に最も近い部位にもびまん性に核分布が認められた。染色に雌雄差は認められなかった。

腎臓の染色では、近位曲尿細管上皮及びボーマン嚢の壁領域に非常に強い点状分布が認められた。更に、遠位尿細管及び集合管、並びに糸球体係蹄内にも分布が認められたが、その分布は他の部位よりも有意に少なかった。これらの試料では HALO 分析は実施しなかった。

13 週間試験（休薬 13 週間）

CD-1 マウスにベピロビルセン 0（媒体）、4、12、40 又は 100 mg/kg/回を試験 1、3、5 及び 7 日に皮下投与し、その後試験 14 から 91 日まで週 1 回、13 週間皮下投与した（雌雄各 10 匹/群、回復性評価のため 12 及び 100 mg/kg 群には雌雄各 6 匹/群を追加）。その後 13 週間の休薬期間を設定した（2019N417087、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.2）。本試験で得られたベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度を 2.6.5 表 17 に示す。

肝臓及び腎臓はオリゴヌクレオチドの主要な分布器官である[Geary, 2015; Geary, 2015; Yu, 2007]。ベピロビルセン投与群の試験 93 日及び休薬群の試験 182 日に採取した肝臓及び腎臓組織試料を用いて、ベピロビルセンの組織中濃度を評価した。肝臓組織中のベピロビルセン濃度はバリデートされた HPLC 法を用いて測定した。腎臓組織は、適格性が確認されたがバリデーションされていない HPLC 法を用いて、情報提供のみを目的として測定した。腎臓及び肝臓組織を用いたそれぞれの HPLC クロマトグラムから、ベピロビルセン及びその代謝物の相対ピーク面積百分率も算出した。

試験 93 日の肝臓組織では、ベピロビルセンの曝露量は用量に比例して増加した。4 及び 12 mg/kg 群の曝露量は雌雄で同程度であったが、40 及び 100 mg/kg 群の曝露量は、雌では雄の最大 1.6 倍であった。腎臓組織ではベピロビルセンの曝露量は用量比を下回って増加し、すべての用量で明らかな性差が認められ、雌では雄の最大 2.8 倍であった。試験 93 日では、4 及び 12 mg/kg の用量で腎臓中濃度が最も高かったが、40 及び 100 mg/kg の用量では肝臓中濃度が腎臓中濃度よりも高かった。これは腎臓への取り込みが飽和したためと考えられる。

12 及び 100 mg/kg/週の用量で 13 週間の休薬期間後（試験 182 日）に回復性を評価した。100 mg/kg 群では、肝臓 12 検体中 2 検体のみでベピロビルセンが検出された。この結果は肝臓組織からのベピロビルセンの消失が遅いことと一致する。

試験 93 日に 100 mg/kg/回群から採取した腎臓及び肝臓組織では、未変化体に加えて、ヌクレアーゼによる切断と一致する推定オリゴヌクレオチド代謝物が認められた。個々の代謝物濃度は総ピーク面積の 10%未満であった。ベピロビルセンは最も多く存在したオリゴヌクレオチド種であり、試験 93 日に存在する総オリゴヌクレオチドの約 58～84%を占めた（総ピーク面積%に基づく）。以上より、ベピロビルセンは緩徐で持続的なヌクレアーゼ代謝によりマウス組織から消失することが示唆された。

13 週間不純物安全性確認試験

CByB6F1 WT マウスにベピロビルセンを 0（媒体）、4、12 及び 40 mg/kg/回の用量で試験 1、3、5 及び 7 日に皮下投与し、その後は試験 91 日まで週 1 回、計 16 回投与した（各群雌雄各 12 匹）。TK 評価は、試験 1 及び 91 日に採取した血漿試料、並びに試験終了時（試験 93 日）に採取した肝臓及び腎臓試料を用いて実施した（2019N406770、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.3）。本試験で得られたベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度 2.6.5 表 18 に示す。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

ベピロビルセンはすべての用量で肝臓及び腎臓試料中で定量可能であった。肝臓及び腎臓中濃度は、雌雄ともに用量の増加に伴って増加した。全体として、濃度は用量比を下回って増加したが、例外として肝臓中濃度は 4～12 mg/kg/回の用量範囲では雌雄ともに用量比をわずかに上回って増加した。肝臓中のベピロビルセン濃度は雌雄で概ね同程度であったが、腎臓中濃度は雄よりも雌で概ね高かった。媒体群の肝臓及び腎臓中におけるベピロビルセン濃度は定量下限（50 ng/g）未満であった。

13 週間不純物安全性試験

不純物の安全性を確認し、3.2.S.4.1 に記載した規格値の妥当性を裏付けるため、13 週間反復投与毒性試験を追加で実施した。CD-1 マウスにベピロビルセン 0（媒体）及び 12 mg/kg/回を試験 1、3、5 及び 7 日に皮下投与し、以降は週 1 回の頻度で 13 週間皮下投与した（各群雌雄各 12 匹）。更に雌雄各 6 匹/群を追加し、試験 92 日の最終剖検時に組織採取及び生体試料分析を実施した（2021N488385、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.4）。本試験で得られたベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度を m2.6.5 表 16 に示す。

ベピロビルセンの腎臓中濃度は雌の方が雄よりも高かったが（2.8 倍）、肝臓中濃度は雌雄で同程度であった。雌雄の対照群の肝臓及び腎臓におけるベピロビルセン濃度は定量下限（50 ng/g）未満であった。12 mg/kg/回群の腎臓中ベピロビルセン濃度は、雄（70000 ng/g）と比較して雌（198000 ng/g）で高かった。肝臓中では雌雄で同程度であったが、わずかに雄の方が高かった（雄：48800 ng/g、雌：42900 ng/g）。

26 週間試験（休薬 13 週間）

CD-1 マウスにベピロビルセン 0（媒体）、3、10、30 及び 60 mg//kg/回を試験 1、5、10 及び 14 日に皮下投与し、その後試験 21 日から試験 182 日まで週 1 回投与した（各群雌雄各 12 匹、回復性評価のため 0、30 及び 60 mg/kg 群に各群雌雄各 6 匹を追加）。その後 13 週間の休薬期間を設定した（2019N419097、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.5）。本試験で得られたベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度を 2.6.5 表 19 に示す。

投与期間終了時及び休薬期間終了時に動物から肝臓及び腎臓の組織試料を採取した。媒体群から採取した肝組織、並びにベピロビルセン投与群から採取した肝及び腎組織を用いて、ベピロビルセン濃度を測定した。媒体群の腎組織は採取したが測定しなかった。ベピロビルセンは腎臓及び肝臓に広範に分布した。概して、検討したすべての用量で、腎臓中濃度は肝臓中濃度と比較して同程度かわずかに高かった。組織中濃度は用量依存的であり（3～60 mg/kg）、腎臓では用量比を下回りって増加し、肝臓では用量比を上回って増加した。休薬期間中にベピロビルセンの組織からの消失が認められた。概して、ベピロビルセンの腎臓中濃度は雄よりも雌で高く、一方、肝臓中濃度は雌よりも雄で高かった。

104 週間がん原性試験

CD-1 マウスを用いた 104 週間がん原性試験において、肝臓及び腎臓中ベピロビルセン濃度を測定した。マウス（各群雌雄各 70 匹、組織解析用に各群雌雄各 6 匹を追加）にベピロビルセン（3、10、30 mg/kg/回）又は媒体を皮下投与した（2021N489170、4.2.3.4.1）

（2.6.6.5.2.1.1）。この試験で得られたベピロビルセンの TK パラメータを 2.6.5 表 20 に示す。ベピロビルセンを投与したすべての動物で、試験 92 日の投与後に肝臓及び腎臓組織中にベピロビルセンが検出された。ベピロビルセンの腎臓中濃度は雄よりも雌で高く、肝臓中濃度は雌雄で同程度であり、マウスを用いた 13 週間及び 26 週間反復投与毒性試験で認められた傾向と一致していた。組織試料の分析は適格な方法を用いて実施した。LC-MS/MS データの取り込み及びピーク面積の積分には、Analyst ソフトウェア（version 1.7.2、HotFix3）を用いた。

3.3.1.2. サル

13 週間試験（休薬 13 週間）

サルにベピロビルセン 0（媒体）、4、8 又は 12 mg/kg/回を試験 1、3 及び 5 日に静脈内負荷投与した後、試験 7 日から 91 日まで週 1 回皮下投与した（第 1、2、3 及び 4 群）。別の群のサル（第 5 群）にベピロビルセン 40 mg/kg/回を試験 1、3 及び 5 日に皮下投与し、その後試験 7 日から 91 日まで週 1 回皮下投与した。雌雄各 3 匹を各投与群に割り付け、更に各群雌雄各 2 匹を 12 及び 40 mg/kg 群に割り付けて回復性を評価した。更に、雌雄各 7 匹を 8 mg/kg TK 群（第 6 群）に割り付け、試験 1、3、5 及び 7 日に皮下投与した（表 3 参照）（2019N417078、4.2.3.2）（2.6.6.3.3.1.1）。本試験で得られたベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度並びに血漿中曝露との比較を 2.6.5 表 21 に示す。

すべての群の動物から肝臓及び腎臓組織を指定の試験日（第 1～5 群の試験 93 日、第 1 群及び第 4～5 群の試験 182 日（休薬期間）並びに第 6 群の試験 3、9、16、23、30、44 及び 58 日）に採取し、ベピロビルセン濃度を測定した。組織試料の分析にはバリデートされていない HPLC 法を用いた。第 1 群（媒体群）から採取した組織については測定しなかった。

概して、試験 93 日の第 2～5 群で認められたように、腎皮質及び肝臓中濃度は用量依存的に増加したが、その増加は用量比を下回っており、ベピロビルセンの用量を約 10 倍に増量すると腎皮質及び肝臓組織でそれぞれ 5.3 倍及び 4.3 倍増加した。

第 4 群（12 mg/kg 皮下投与）及び第 5 群（40 mg/kg 皮下投与）の動物では、13 週間の休薬期間（試験 93～182 日）終了後、評価したすべての組織中のベピロビルセン濃度が約 96～98%低下した。ベピロビルセンの組織中濃度を検討した結果、組織への分布に明らかな又は一貫した性差は認められなかった。

組織／血漿間の濃度比を推定するために、腎臓、肝臓及び血漿における分布後相の AUC2-51d［試験 7 日の最終皮下投与後 2～51 日（試験 9～58 日）の曲線下面積］を推定した。各組織中の AUC2-51d の比を［組織／血漿］として算出した。第 6 群の腎皮質及び肝組織における AUC2-51d の推定値は、血漿中 AUC2-51d の推定値と比較して、それぞれ 10500 倍及び 3920 倍高かった。休薬期間中の第 4 群及び第 5 群の組織中半減期は、それぞれ 14.7 日及び 15.7 日（腎臓）並びに 19.9 日及び 19.2 日（肝臓）であった。これらの半減期は血漿中終末相半減期と比較して同程度であったが、血漿中半減期の算出では動物数が限られていたため（第 4 群は N＝1、第 5 群は N＝2）、この評価の解釈には注意が必要である。第 6 群の血漿中半減期も同程度であった（10.6 日）。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

試験 93 日に第 5 群から採取した腎臓及び肝臓試料では、未変化体に加えて、ヌクレアーゼによる切断と一致する推定オリゴヌクレオチド代謝物が認められた。検出された個々の代謝物濃度は総ピーク面積の 10%未満であった。最も多く存在したオリゴヌクレオチド種はベピロビルセンであり、試験 93 日に検出された総オリゴヌクレオチドの約 74～90%を占めた。これらのデータから、ベピロビルセンはサルの組織において緩徐で持続的なヌクレアーゼ代謝により消失することが示唆された。

39 週間試験（休薬 26 週間）

カニクイザルにベピロビルセンを 0（媒体）、3、6、10 及び 20 mg/kg/回の用量で試験 1、5、10 及び 14 日に皮下投与し、その後試験 21 日から 39 週まで週 1 回皮下投与した（各群雌雄各 4～5 匹、回復性評価のため 10 及び 20 mg/kg 群には各群雌雄各 2 匹を追加した）。本試験では合計 56 匹のカニクイザル（雌雄各 28 匹）を使用し、すべてのサルを本試験の TK 評価に使用した（2.6.6.3.3.1.2）（2019N419364、4.2.3.2）。本試験で得られたベピロビルセンの肝臓及び腎臓中濃度を 2.6.5 表 22 に示す。

投与期間終了時の剖検（試験 275 日）及び休薬期間終了時の剖検（試験 455 日）において、あらかじめ割り付けたすべての動物から、肝左葉及び左腎皮質の一部を採取した。ベピロビルセン投与群の肝臓及び腎臓試料中のベピロビルセン濃度を、適格性が確認された HPLC 法（非 GLP）を用いて測定した。

ベピロビルセンは肝臓及び腎臓組織に分布し、腎臓中濃度は肝臓中濃度に比べて高かった。概して、組織中濃度は用量比を下回る増加を示した。26 週間の休薬期間終了時には、肝臓及び腎臓組織中にベピロビルセンは検出されなかった。腎臓及び肝臓中濃度に明らかな性差は認められなかった。

3.3.2. 胎盤及び乳汁への移行性

3.3.2.1. マウス

マウスの受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

CD-1 マウス（各群雌雄各 25 匹）にベピロビルセンを皮下投与した受胎能及び発生に関する併合試験において、組織曝露及び胎盤移行性を評価した。ベピロビルセン 3、15 及び 25 mg/kg（それぞれ 10.5、52.5 及び 87.5 mg/kg/週）を、雄には試験 71 日まで、雌には交配前 2 週間から妊娠中の器官形成期まで隔日皮下投与した（2017N337889、4.2.3.5.1）（2.6.6.6.2.1）。本試験で得られたベピロビルセンの TK パラメータを 2.6.5 表 24 に示す。

組織試料を採取し、バリデートされた HPLC 法によりベピロビルセン濃度を測定した。肝臓では、雌雄ともにベピロビルセンの用量依存的な曝露が認められた。雄では雌と比較して肝臓中濃度が高かったが、これは雄の方が雌よりも投与回数が多く、投与期間が長かったためと考えられる。胎盤では、低用量群でベピロビルセンは検出されず、中用量及び最高用量群ではわずか（母動物肝臓中濃度のそれぞれ 1.9%及び 5.4%未満）に定量された。いずれの投与群においても胎児肝臓中のベピロビルセンは定量下限未満であったことから、胚又は胎児への移行性は低いことが示唆された。

マウス PPND 試験

雌 CD-1 マウス（各群 24 匹）にベピロビルセン 0（媒体）、3、15 及び 25 mg/kg/回を 2 日に 1 回、妊娠 6～18 日（交配したが出産しなかった雌）又は妊娠 6 日から分娩後 21 日（出産した母動物）に投与した。追加でサテライト群（各群 6 匹）を設け、上記主試験群と同じ投与スケジュールで分娩後 10 日（剖検日）まで投与した。生体試料中薬物濃度測定のため、乳汁及び肝臓組織を採取した（2023N530614、4.2.3.5.3）（2.6.6.6.4.1）。本試験で得られたベピロビルセンの TK パラメータを 2.6.5 表 26 に示す。

LC-MS/MS を用いて肝臓及び乳汁中のベピロビルセン濃度を測定した。母動物の肝臓中濃度は用量に比例して増加した。15 mg/kg/回以上の群では分娩後 10 日の乳汁中並びに生後 10 日及び 21 日の出生児肝臓中の曝露はごくわずか（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）であった。

3.3.2.2. ウサギ

胎盤移行及び母体・胎児の肝臓中濃度

妊娠 NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において、ベピロビルセンを 6、12.6 及び 25.5 mg/kg（それぞれ 21、44.1 及び 88.2 mg/kg/週に相当）の用量で妊娠 6～18 日まで隔日皮下投与し（各群 22 匹）、組織曝露量を評価した（2017N337736、4.2.3.5.2）（2.6.6.6.3.1.2）。本試験で得られたベピロビルセンの肝臓及び胎盤中濃度を 2.6.5 表 25 に示す。

適格性が確認された HPLC-UV 法により肝臓組織試料を分析した。胎児の肝臓は成人の肝臓と同等のマトリックスであると考えられた。同じ方法を用いて胎盤組織を分析したが、この方法は胎盤組織について特に適格性及び妥当性が確認されていないため、結果は情報提供のみを目的として提示する。

母動物では、全投薬群で肝臓中にベピロビルセンは検出され、肝臓中濃度は用量依存的に増加した。いずれの用量群においても、肝臓中濃度は妊娠 28 日（最終投与後 10 日）と比較して妊娠 20 日（最終投与後 2 日）で高かった。胎盤では、中用量群及び高用量群で妊娠 20 日、高用量群では妊娠 28 日に低濃度のベピロビルセンが定量された（いずれも母動物肝臓中濃度の 7%以下）。いずれの用量群においても胎児肝臓中濃度は定量下限（100 ng/g）未満であったことから、ベピロビルセンは胚・胎児に移行する可能性は低いことが示唆された。

表 6　マウス及びサルにベピロビルセンを皮下投与した時の腎臓及び肝臓組織中濃度

Species (Duration) (No. animals/sex/group) Report No	Dose (mg/kg)	Kidney (µg/g Tissue)		Ratio of Animal to Human Kidney Exposure[b]	Liver (µg/g Tissue)		Ratio of Animal to Human Liver Exposure[c]
		Male	Female		Male	Female	
Mouse (CD-1) (13 Weeks) (n=6M/6F) 2019N417087	4	36.1	55.4	0.35	20.1	12.3	0.09
	12	**54.8**	**137**	**0.73**	**57.0**	**58.4**	**0.34**
	40	86.8	163	0.95	226	157	1.11
	100	159	440	2.27	459	304	2.22
Mouse (CD-1) (13 Weeks) (n=6M/6F) 2021N488385	**12**	70.0	198	1.02	48.8	42.9	0.27
Mouse (CByB6F1 (Wild Type)) (13 Weeks) (n=6M/6F) 2019N406770	4	67.4	103	0.65	30.0	28.2	0.17
	12	94.4	223	1.20	119	136	0.74
	40	**168**	**377**	**2.06**	**251**	**213**	**1.35**
Mouse (CD-1) (26 Weeks) (n=12M/12F+6M/6F[R]) 2019N419097	3	31.7	38.1	0.26	9.5	9.3	0.05
	10	**58.4**	**131**	**0.72**	**68.3**	**40.1**	**0.32**
	30	89.9	215	1.15	183	113	0.86
	60	134	470	2.29	315	221	1.56
Mouse (CD-1) (104 Weeks) (n=70M+6M tissue analysis) 2021N489170	3	28.2	44.9	0.28	14.4	14.4	0.08
	10	76.7	147	0.85	43.6	43.6	0.25
	30	85.7	229	1.19	161	121	0.82
Monkey[a] (cynomolgus) (13 Weeks) (n=3M/3F+2M/2F[R]) 2019N417078	4	420		3.18	241		1.40
	8	**623**		**4.72**	**467**		**2.72**
	12	1020		7.73	581		3.38
	40	2240		16.97	1040		6.05
Monkey[a] (cynomolgus) (39 Weeks) (n= Up to 7M/7F) 2019N419364	3	314		2.38	191		1.11
	6	**709**		**5.37**	**353**		**2.05**
	10	911		6.90	441		2.56
	20	1050		7.95	532		3.09

Key:
a = No gender differences were observed, therefore average data is provided for monkey.
b = Based on PBPK Modelling, the estimated human kidney exposure following 300 mg dose = 132 µg/g tissue (GSK Study No. 2024N562088).
c = Based on PBPK Modelling, the estimated human liver exposure following 300 mg dose = 172 µg/g tissue (GSK Study No. 2024N562088).
NOAEL = No Observed Adverse Effect Level (**bolded**); R = Recovery; NA = Not Applicable.

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

表 7　雌マウス及びウサギにベピロビルセンを皮下投与した時の胎盤及び肝臓組織中濃度

Species (study type) [Report No; CTD Location]	Dose (mg/kg/Dose)	Gestation Day	N	Maternal Liver (µg/g)	Placenta (µg/g)	Fetal Liver (µg/g)
Mouse (FEED) [2017N337889; m4.2.3.5.1]	3	GD18	4	39.7	BLQ	BLQ
	15	GD18	5	217	4.23	BLQ
	25	GD18	4	328	17.6	BLQ
Rabbit (EFD) [2017N337736; m4.2.3.5.2]	6	GD20	2	194	BLQ	BLQ
		GD28	4	82.5	BLQ	BLQ
	12.6	GD20	2	452	20.6	BLQ
		GD28	5	160	BLQ	BLQ
	25.2	GD20	2	796	51.5	BLQ
		GD28	5	392	11.2	BLQ
Mouse (PPND) [2023N530614; m4.2.3.5.3]	3	10	6	77.82	NM	BLQ
		21	6	255.83		BLQ
	15	10	5	456.17		0.04
		21	6	476.50		0.05
	25	10	5	830.00		0.18
		21	6	898.83		0.14

Note: All studies were conducted with bepirovirsen (also known as GSK3228836)
Key: BLQ = Below limits of quantification. EFD = Embryofetal Development. FEED = Fertility and Embryofetal Development. GD: Gestation Day. NM = not measured. PPND = Pre and Postnatal Development.

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

表 8 F0 及び F1 世代 CD-1 マウスにおけるベピロビルセンの肝臓組織及び乳汁中濃度

		Dose of Bepirovirsen (mg/kg)			
Matrix	**LD/PND**	**0**	**3**	**15**	**25**
Maternal liver[a] (µg/g)	10	NA	77.82 (59.70 – 89.10)	456.16 (312 – 552)	830 (634 – 1200)
	21	BLQ<50.0 (BLQ – BLQ)	255.83 (111 – 882)	476.50 (266 – 619)	898.83 (756 – 1010)
Milk[a] (µg/mL)	10	NA	BLQ <0.01 (BLQ – BLQ)	0.01 (BLQ – 0.03)	0.02 (0.01 – 0.03)
Pup liver[a, b] (µg/g)	10	NA	BLQ <0.05 (BLQ – BLQ)	0.04 (BLQ – 0.30)	0.17 (BLQ – 0.49)
	21	BLQ <0.05 (BLQ – BLQ)	BLQ <0.05 (BLQ – BLQ)	0.04 (BLQ – 0.30)	0.13 (BLQ – 0.73)

Data from PPND report 2023N530614; m4.2.3.5.3

Key: BLQ = below the limit of quantitation. LD = Lactation Day: NA = Not Applicable. PND = Postnatal Day. PPND: Pre and Post Natal Development.

a: Group mean value (range)

b: Sexes combined.

4. 代謝

ベピロビルセンのような 2’-MOE ASO は、エンドサイトーシス及びミクロピノサイトーシスによりそれぞれ肝臓及び腎臓に取り込まれ、内因性エンドヌクレアーゼにより代謝されると考えられる[Shemesh, 2016; Yu, 2016; Geary, 2015]。

マウス、ウサギ、サル及びヒト肝 S9 画分を用いてベピロビルセンの in vitro 代謝を検討した。マウス及びカニクイザルの毒性試験において採取した肝臓及び腎臓試料における代謝についても評価した。202009 試験で患者から採取したヒト血漿試料をプールし、定性的に分析してヒト肝臓における代謝プロファイルを明らかにした。

全体として、in vitro と in vivo のいずれにおいても、ベピロビルセンの代謝様式は、すでに臨床報告されている ASO であるベピロビルセンの GalNAc プロドラッグ（ヒト血漿及び尿中での代謝がすでに測定されている[Han, 2019]）及び mipomersen[Geary, 2015; Post, 2019]と同様であった。

以下に示す in vivo 及び in vitro での試験結果並びにこのクラスの類似 ASO の公表臨床データ[Geary, 2015; Geary, 2015; Yu, 2016; Post, 2019; Han, 2019]に基づき、ベピロビルセンの追加の臨床代謝試験（放射性標識体を用いたマスバランス試験等）は実施していない。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

表 9　ベピロビルセンの代謝試験一覧

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Mechanistic Static Model	CYP family enzymes	NA	In silico	NA	NA	No	GSK	2023N526136	m4.2.2.4
Metabolism	Mouse, Rabbit, Monkey, Human S9 liver fractions	NA	In vitro	20 µM	24h	No	GSK	2024N562723 (24DMS001)	m4.2.2.4
Induction of CYP450 1A2, 2B6 and 3A4	human hepatocytes	NA	In vitro	0.01-200 µM	NA	No	GSK	2022N522535 (22DMM045)	m4.2.2.4
Inhibitor of CYP450 and glucuronosyl transferase	human hepatocytes	NA	In vitro	Up to 100 µM	NA	No	[redacted]	2022N522533 (XT225122)	m4.2.2.4
Metabolism (Liver and Kidney)[f]	Mouse (CD-1)	6M/6F	SC	0, 4, 12, 40, 100[a]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[d,e]	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
Metabolism (Liver and Kidney)[g]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F2M/ 2F[R] 3M/3F+2 M/2F[R] 7M/7F	IV/SC SC SC	0, 4, 8, 12 40[b] 8[c]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[d,e]	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
Metabolism (plasma)	Human	25 subjects per pool	SC	300[h]	24 week	No	[redacted]	2025N567431	m4.2.2.4

表 9　ベピロビルセンの代謝試験一覧（続き）

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Note: All studies have been conducted with Bepirovirsen sodium the parent compound (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted. **Key:** Cytochrome P450 Enzymes. IV = Intravenous; NA = not applicable; R = Recovery; SC = Subcutaneous. a = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13). b = Animals were dosed IV or SC on Days 1, 3, 5, then weekly SC doses from Day 7 (Week 1) to Day 91 (Week 13). c = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7 only. d = The analysis of GSK3228836 in kidney samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. e = Sample evaluation from the 100 mg/kg group for the presence of metabolites was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. f = Samples from a 13-week toxicology study in mice. g = Samples from a 13-week toxicology study in monkeys h = plasma pooled from week 24 plasma PK samples from 25 individuals (study number 202009, see also m2.7.2, Section 3 and m2.5 for additional information on the clinical study)							**Testing Facility:** GSK = GSK [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted]		

4.1. In Vitro

4.1.1. 肝 S9 画分における代謝

ベピロビルセンの推定代謝経路を評価するため、20 μM の目標濃度でマウス、ウサギ、カニクイザル及びヒトの肝 S9 画分と最長 24 時間、適切な対照とともにインキュベートした。すべての試料を UHPLC-MS で分析した（2024N562723、4.2.2.4）。本試験の概要を 2.6.5 表 28 に示す。

アラメチシン溶液を添加した 2070 μL の 100 mM リン酸カリウムバッファーに 300 μL の S9-mix を添加し、媒体（DMSO）又は 2 mM ベピロビルセン溶液（50 mg/mL のベピロビルセン溶液を DMSO で希釈）を 30 μL 添加して、37℃で 5 分間プレインキュベートした。この混合溶液の 800 μL を分取し、補因子溶液 200 μL と混合してドライアイス上で瞬間凍結したものを 0 時間試料とした。残りの混合溶液 1600 μL に補因子溶液又は対照として 2%（v/v）炭酸水素ナトリウムバッファーを 600 μL を添加して、インキュベートを開始した。試料を 37℃で 5 時間又は 24 時間、振とうしながらインキュベートした後、溶液の一部を分取し、ドライアイス上で瞬間凍結した。

インキュベート開始時に、誤って（必要な 400 μL ではなく）600 μL の補因子溶液を添加したため、5 及び 24 時間のインキュベート後の試料におけるベピロビルセンの最終濃度は 18.2 μM となったが、すべての種の 0 時間試料で 20 μM のベピロビルセンによる影響は認められなかったため、この軽微な逸脱は試験結果に重大な影響を及ぼさないと判断した。

ベピロビルセンとのインキュベートと並行して、陽性対照として 20 μM の 7-エトキシクマリンを、すべての動物種の肝 S9 画分とインキュベートした（0、5 及び 24 時間）。

瞬間凍結した S9 画分とのインキュベート試料は、室温で最長 20 分間解凍し、一部を分取して消化し、SPE マイクロプレートで処理した後、UHPLC-MS を用いて分析した。

24 時間後のすべての試料において、ベピロビルセンが主要な薬物関連成分であり、ベピロビルセンの代謝物は検出されなかった。ベピロビルセンの標準物質中に微量の薬物由来不純物（D1）が同定されたが、これは［N-1（n-MOE-（5-メチルシチジン）］成分に相当し、24 時間のインキュベート後まで一定であった。D1 は補因子を添加しない対照試料においても同程度の濃度で認められた。

すべての動物種において、肝 S9 画分中のベピロビルセンは 24 時間まで安定であり、未変化体の消失は認められなかった。インキュベートした肝 S9 画分中に他の微量の薬物関連成分が生成した可能性があるが、本試験の条件下では検出されなかった。

4.1.2. CYP1A2、2B6 及び 3A4 の誘導

CYP（CYP1A2、2B6 及び 3A4）の mRNA 量に対する影響を検討するため、ベピロビルセンと 3 例のドナー由来の初代培養ヒト肝細胞とをインキュベートした（2022N522535、4.2.2.4）。本試験の概要を 2.6.5 表 33 に示す。

ヒト肝細胞を 0.5、0.3 又は 0.1%（v/v）DMSO（媒体コントロール）、リファンピシン（0.01～30 μM）、フェノバルビタール（1500 μM）、オメプラゾール（100 又は 150 μM）又はフルマゼニル（50 μM）のいずれかと、triplicate でインキュベートした。また、0.5、0.3

又は 0.1%（v/v）DMSO とともに、ベピロビルセンを 0.01～200 μM でインキュベートした。総インキュベート時間は 48 時間とした。試験 2 日の 0、4 及び 24 時間後（すなわちインキュベート開始後 24、28 及び 48 時間）に、ベピロビルセン（0.01～200 μM）を含むウェルから培地を採取し、アセトニトリルを添加した。培地試料は化合物濃度の測定まで、約-70℃で保存した。ベピロビルセンの濃度測定用の培地試料は、ベピロビルセンを添加したウェルからのみ採取した。

更に、細胞の健康状態を評価するために、DMSO のみ、又はドナー1 には 0.01～100 μM のベピロビルセン、ドナー2 には 0.3～100 μM のベピロビルセン、ドナー3 には 0.3～200 μM のベピロビルセンを、それぞれ triplicate で処理するウェルを設けた。

その後、細胞から RNA を抽出し、定量した。リボソーム RNA の標準曲線（0～2000 ng/mL）を作成した。Ribogreen 試薬をすべての試料に添加し、室温で 2～5 分間インキュベートした。蛍光を測定し、標準曲線を用いて RNA 濃度を求めた。High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit を用いて total RNA から cDNA を作製した後、TaqMan 前増幅工程を実施した。試験対象の各遺伝子（CYP1A2、2B6 及び 3A4、ハウスキーピング遺伝子 18S は除く）に対して等量の 20×Taqman Gene Expression Assay primer/probe を混合して、TaqMan Gene Expression Assay mix を調製した。CYP1A2、2B6 及び 3A4 並びにハウスキーピング遺伝子 18S の mRNA 量は、それぞれ RT-PCR を用いて定量的に検出した。

ドナー1 の肝細胞では、100 μM のオメプラゾール処理により CYP1A2 の mRNA 量が増加し、コントロールに比べて 3.38 倍であった。この結果は陽性誘導シグナルの判定基準（>2 倍）を満たしているが、過去に観察された増加よりも低かった。そのため、ドナー2 及び 3 には 150 μM のオメプラゾールで処理することとした。ドナー2 及び 3 のオメプラゾール処理細胞では、コントロールに比べてそれぞれ 10.1 及び 7.58 倍増加した。3 例のドナーの CYP1A2 mRNA に対する平均誘導レベルは 7.02±3.39 倍であった。

いずれの典型的誘導剤も 2 倍を超える誘導を示し、これは過去の分析法バリデーションで認められたデータとも一致していた。

0.01～200 μM のベピロビルセンを肝細胞（ドナー1、2 及び 3）と 48 時間インキュベートした。試験 2 日の 3 時点（0、4 及び 24 時間）における培地中のベピロビルセン濃度を測定した。ベピロビルセン低濃度では非特異的結合が認められたが、非特異的結合は 24 時間のインキュベーション時間中にほとんど変化しなかったため、各濃度の平均値を算出し、後述するドナー2 の EC50, u の算出に用いた。

検討した 3 例のドナーにおいて、ベピロビルセンは CYP1A2 及び 2B6 を誘導しなかった。

ベピロビルセンは、in vitro でドナー2 の肝細胞のみで CYP3A4 の軽度な誘導作用を示し、EC50 及び Emax はそれぞれ 24.2 μM 及び 2.35 倍であった。更に、ICH M12 に従い、ベピロビルセンの非結合型濃度を用いて算出した EC50, u 及び Emax はそれぞれ 13.6 μM 及び 2.28 倍であった。ベピロビルセンはドナー1 及び 3 の細胞では CYP3A4 を誘導しなかった。

ベピロビルセンとインキュベートした一部のウェルで、mRNA の減少が認められた（0.5 倍未満）。しかし、この減少は用量依存的ではなく、ドナー及び検討した遺伝子間でばらつ

きが認められた。したがって、原因は確定的ではないものの、用量依存性がないため、化合物による遺伝子抑制の可能性は低いと考えられた。

4.1.3. CYP 及びグルクロン酸転移酵素の阻害

ヒト凍結肝細胞懸濁液を用いて、ヒト CYP 及び UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）に対するベピロビルセンの阻害作用を検討した（2022N522533、4.2.2.4）。本試験の概要表を 2.6.5 表 34 に示す。

IC50 を算出するため、酵素活性を HPLC-MS により測定した。1×10^6 cells/mL の濃度で懸濁したヒト凍結肝細胞に、Km 又は S50 に概ね相当する濃度のプローブ基質を添加してインキュベートした。ベピロビルセン濃度は 0、0.1、0.3、1、3、10、30 及び 100 μM とした。

CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5 及び UGT に対するベピロビルセンの in vitro 阻害作用を、ベピロビルセンの存在下及び非存在下で各酵素活性を測定することにより検討した。ベピロビルセンをプローブ基質及びヒト凍結肝細胞と duplicate でインキュベートした。約 10 分間の反応後、内標準物質を添加した反応停止薬を添加することにより、反応を停止させた。試料を遠心分離し、上清画分を LC-MS/MS により分析した。また、ベピロビルセンの代わりに各 CYP の既知の直接阻害剤又は UGT の広域阻害剤を用いてインキュベートした。

ベピロビルセンは CYP2C8 を直接阻害し、検討した最高濃度（100 μM）で 42.6%阻害した。ベピロビルセンによる CYP2C8 の直接阻害は 50%未満であったため、IC50 値は 100 μM 超と報告された。

ベピロビルセンは 100 μM の濃度まで CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5（ミダゾラム又はテストステロンにより測定）を直接阻害せず、また、UGT を介した 4-メチルウンベリフェロンのグルクロン酸抱合についても直接阻害しなかった。評価したいずれの CYP に対してもベピロビルセンの時間依存的な阻害作用は認められなかった。

4.1.4. In silico

ベピロビルセンの治療用量 300 mg を皮下投与した時（対応する推定 Cmax：1.14 μM）の酵素及びトランスポーターに対する相互作用薬としての薬物動態学的 DDI リスクを、Basic 法及びメカニズムに基づく静的モデルにより評価した（2023N526136、4.2.2.4）（6 項参照）。

本モデルの結果から、ベピロビルセンは CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4 の臨床的に重要な可逆的阻害剤又は時間依存的阻害剤ではなく、UGT に対しても可逆的に阻害しないことが示された。また、ベピロビルセンは CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 の臨床的に重要な誘導物質ではなかった。ベピロビルセンは、P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、MRP2、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の臨床的に重要な阻害薬ではなかった。本試験の概要を 2.6.5 表 29 に示す。また、薬物動態学的薬物相互作用の可能性について、6 項に記載する

4.2. In Vivo

4.2.1. マウス

4.2.1.1. マウス組織における皮下投与後の代謝プロファイル

13 週間の休薬期間を設けたマウス 13 週間反復投与毒性試験（2019N417087、4.2.3.2）（2.6.6.3.2.1.2）で採取した肝臓及び腎臓試料を用いて、ベピロビルセンの代謝プロファイルを検討した。CD-1 マウスにベピロビルセン 0（媒体）、4、12、40 又は 100 mg/kg/回を試験 1、3、5 及び 7 日に皮下投与し、その後試験 14 日から 91 日まで週 1 回、皮下投与した（投薬群には各群雌雄各 10 匹を割り当て、回復性評価用として 12 及び 100 mg/kg 群の各群に雌雄各 6 匹を追加）。本試験の概要を 2.6.5 表 30 に示す。

試験 93 日の最終剖検時に 100 mg/kg 群から採取した肝臓 12 検体及び腎臓 12 検体について、ベピロビルセン及びその代謝物の相対的割合（総ピーク面積に対する割合）を測定し、代謝物の定性的分析を行った。

液液抽出法及び固相抽出法を用いて組織試料を調製し、UV 検出 LC で分析した。ベピロビルセン（N）の代謝物 N-1～N-15 のクロマトグラムをモニタリングした（図 1）。肝臓では、未変化体ベピロビルセンに加えて、合計 12 種類の代謝物（N-1、N-5~N-15）がクロマトグラム上に認められ、個別に積分された。腎臓では、未変化体ベピロビルセンに加えて、合計 11 種類の代謝物（N-1、N-6～N-15）がクロマトグラム上に認められ、個別に積分された。各代謝物は、分析法バリデーションにおいて測定した N-1 及び N-10 代謝物標準物質の相対保持時間との比較に基づいて暫定的に同定した。

最も多く検出された ASO はベピロビルセンであり、総 ASO の 58～84%を占めた（総ピーク面積%に基づく）。

評価した腎臓及び肝臓では、未変化体に加えて、ヌクレアーゼによる切断と一致する推定オリゴヌクレオチド代謝物が認められた。個々の代謝物濃度は総ピーク面積の 10%未満であった。以上より、ベピロビルセンは緩徐で持続的なヌクレアーゼ代謝によりマウス組織から消失することが示唆された。

4.2.2. サル

4.2.2.1. サル組織における皮下投与後の代謝プロファイル

13 週間の休薬期間を設けた 13 週間反復投与毒性試験で採取したサルの肝臓及び腎臓組織を用いて、ベピロビルセンの代謝プロファイルを評価した（2019N417078、4.2.3.2）（2.6.6.3.3.1.1）。本試験の概要を 2.6.5 表 30 に示す。

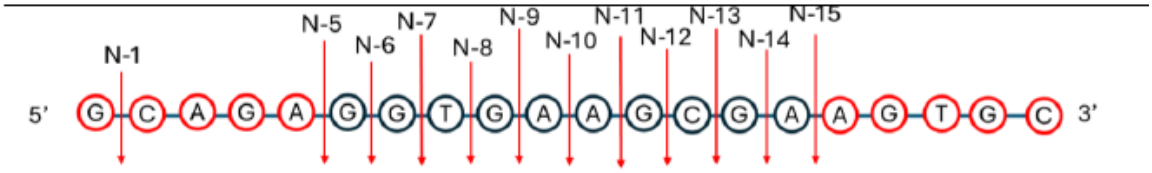
試験 93 日の最終剖検時に第 5 群（40 mg/kg/回を試験 1、3 及び 5 日に皮下投与した後、試験 7 日から試験 91 日までは週 1 回の頻度で皮下投与）（表 3 参照）のサルから採取した肝臓 6 検体及び腎皮質 6 検体について、ベピロビルセン及びその代謝物の相対的割合（総ピーク面積に対する割合）を測定し、代謝物の定性的分析を実施した。液液抽出法及び固相抽出法を用いて組織試料を調製し、UV 検出 LC で分析した。ベピロビルセン（N）の代謝物 N-1～N-15 について、クロマトグラムをモニタリングした（図 1）。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

肝臓では、未変化体ベピロビルセンに加えて、合計 12 種類の代謝物（N-1、N-5～N-15）がクロマトグラム上に認められ、個別に積分された。腎皮質では、未変化体ベピロビルセンに加えて、合計 8 種類の代謝物（N-1、N-8～N-14）がクロマトグラム上に認められ、個別に積分された。各代謝物は、分析法バリデーションにおいて測定した N-1、N-10 及び N-15 代謝物標準物質の相対保持時間と比較して暫定的に同定した（2019N419216、4.2.2.1）。

評価した腎皮質及び肝臓試料では、未変化体に加えて、ヌクレアーゼによる切断と一致する推定オリゴヌクレオチド代謝物が認められた。個々の代謝物濃度は総ピーク面積の 10%未満であった。ベピロビルセンは最も多く存在したオリゴヌクレオチド種であり、試験 93 日に存在する総オリゴヌクレオチドの約 74～90%を占めた。これらのデータから、ベピロビルセンはサルの組織において緩徐で持続的なヌクレアーゼ代謝により消失することが示唆された。

図 1　　マウス及びサルの肝臓及び腎臓におけるベピロビルセンの in vivo 推定代謝物



Metabolite	N-1	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10	N-11	N-12	N-13	N-14	N-15
Mouse												
Liver	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Kidney	✓	ND	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Monkey												
Liver	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Kidney	✓	ND	ND	ND	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND

Key: ND = Not determined

4.2.3.　　ヒト

202009 試験において採取したヒト血漿試料を用いて、中国、日本及びその他の地域（ROW）の被験者のヒト血漿プール中のベピロビルセンの代謝物の同定及びそのプロファイルを検討することを目的とした探索的試験を実施した（2.7.2.3）（2025N567431、4.2.2.4）。本試験の概要を 2.6.5 表 32 に示す。

ベピロビルセンを反復皮下投与した試験 24 週の投与前（前回の投与後 7 日）のベピロビルセン濃度データに基づき、各民族群でベピロビルセン濃度が最も高かった上位 25 例の検体を選択し、同量ずつプールして各民族群の検体とした。選択した被験者のうち、各民族群につき 5 例の試験 1 日の投与前検体を同量ずつプールして、各民族群のコントロール検体とした。前処理として液液抽出、上清の乾燥及び再溶解を行い、最終的に得られた上清を UHPLC-MS で分析した。

ベピロビルセンを反復皮下投与したすべてのヒト血漿プールにおいて、未変化体ベピロビルセン及び計 8 種類の代謝物が検出された。ベピロビルセンの主代謝経路は加水分解であった。

すべての群でベピロビルセンの代謝物が認められ、代謝物はその質量により同定された。この方法は非臨床動物種での試験で用いた方法とは異なるため、代謝物には別の識別番号を付与した。

M1: 5' G–C–A–G 3', G1-G4.

M2: 5' G–C–A–G–A–G 3', G1-G6.

M3: 5' G–C–A–G–A–G–G 3', G1-G7.

M4: 5' G–A–A–G–T–G–C 3', G14-C20.

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

M5: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T 3’, G1-T8.

M6: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T–G 3’, G1-G9.

M7: 5’ G–C–G–A–A–G–T–G–C 3’, G12-C20.

M8: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T–G–A 3’, G1-A10.

Bepirovirsen: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T–G–A–A–G–C–G–A–A–G–T–G–C 3’, G1-C20.

Key: G = Deoxyguanosine; A = Deoxyadenosine; T = Thymidine; C = Deoxy-5-methylcytidine; G = Methoxyethyl guanosine; A = Methoxyethyl adenosine; T = Methoxyethyl thymidine; C = Methoxyethyl 5-methylcytidine; – = phosphorothioate linkage.

各代謝物を定性的に比較した結果、本試験で解析した 3 つの民族間で大きな差は認められなかった。これらの代謝物は切断型であるため、RNase H を誘導する可能性は低く、薬理学的に不活性であると考えられる[Geary, 2015]。

In vivo 及び in vitro での試験結果並びにこのクラスの類似 ASO の公表臨床データ[Geary, 2015; Geary, 2015; Yu; 2016; Post, 2019; Han, 2019]に基づき、ベピロビルセンの追加の臨床代謝試験（放射性標識体を用いたマスバランス試験等）は実施していない。

5. 排泄

他の ASO を用いた試験結果に基づくと[Geary, 2015]、ベピロビルセンは組織で代謝を受けて短鎖化代謝物となり、腎排泄を介して消失すると予想される。なお、健康被験者を対象とした第 1 相試験（213725 試験）において尿を採取し、ベピロビルセン濃度を測定した（2.7.2.3.3.5）。最初の 24 時間におけるベピロビルセンの尿中排泄率は 2%未満であった。

6. 薬物動態学的薬物相互作用

ベピロビルセンと併用される可能性のある薬剤との薬物動態学的相互作用の可能性を検討する in vivo 非臨床試験は実施していない。トランスポーター試験、CYP 阻害／誘導試験及び in silico による DDI 予測から得られた関連データを、それぞれ 3.2.3、3.2.4 及び 4.1 項に要約する。

6.1. 被相互作用

ベピロビルセンは、エンドサイトーシスにより肝臓に、ミクロピノサイトーシスにより腎臓に取り込まれると考えられる[Geary, 2015]。また、ベピロビルセンは内因性エンドヌクレアーゼによって代謝されると予想される[Shemesh, 2016; Yu, 2016]。これらの取り込み及び代謝経路は、HBV を有する被験者に投与される可能性のある抗ウイルス薬（テノホビル、エンテカビル、ラミブジン、アデホビル及び telbivudine 等）によって阻害されない。

更に、3.2 項に記載したように、ベピロビルセンはヒトトランスポーターである BCRP、P-gp 及び MRP2（ABC トランスポーター）並びに MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 又は OCT2（SLC トランスポーター）の in vitro 基質ではなかった（2022N522434、4.2.2.3）。本試験で得られたデータの要約表を 2.6.5 表 27 に示す。

また、ベピロビルセンの第 2a 相試験（205695 試験）では、HBV 持続感染患者にヌクレオシドアナログを併用投与しても、ベピロビルセンの血漿中 PK プロファイルは変化しなかった（2.7.2.3.2.1）。

6.2. 相互作用

一般に、文献的報告では、ASO が薬物代謝酵素及びトランスポーターの強力な直接阻害剤となる可能性は低いことが示唆されており[Yu, 2016; Kazmi, 2019; Ramsden, 2019]、ベピロビルセンによる酵素又はトランスポーターの直接阻害による DDI の可能性は低いと考えられる。

ベピロビルセンは単一ドナー由来のヒト凍結肝細胞において CYP3A4 を軽度の誘導作用を示し、EC50,u 及び Emax,u はそれぞれ 13.6 μM 及び 2.28 倍であった。ベピロビルセンは他の 2 例のドナーの肝細胞では CYP3A4 を誘導せず、また in vitro で CYP1A2 及び CYP2B6 を誘導しなかった。規制ガイダンス基準[EMA, 2013; PMDA, 2018; FDA, 2020; FDA, 2022]に基づき、EC50 及びより保守的な EC50, u の両方の値を用いた Basic 法による静的モデルの結果からは、臨床的に重要な CYP3A4 DDI リスクは予測されなかった（2023N526136、4.2.2.4）。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

ベピロビルセンは in vitro で CYP2C8 及び MRP2 を阻害し、IC50 はそれぞれ 100 μM 超及び 8.49 μM であった。Basic 法による静的モデルの結果から、ベピロビルセンは CYP2C8 及び MRP2 の臨床的に重要な可逆的阻害剤ではないことが予測された。（2022N522434、4.2.2.3）。

In vitro で検討した他のすべての酵素及びトランスポーターはベピロビルセンにより阻害又は誘導されなかった。

サイトカインは代謝酵素の発現を調節し、サイトカインの発現増加は CYP 活性の低下をもたらす可能性がある[Coutant, 2023]。In vitro でヒト PBMC に 200 μM までのベピロビルセンを処理した結果、IL-6 及び IL-10 の産生がそれぞれ最大 22.7 倍及び 3 倍増加した（2.6.2.3.1.2）。ベピロビルセンを 300 mg の用量で臨床投与した時の最大血漿中曝露量は約 10 μg/mL（1.35 μM）であり、IL-6 及び IL-10 が臨床において誘導される可能性は低いと考えられる。

7. その他の薬物動態試験

本カテゴリーに該当するベピロビルセンの試験は実施されていない。

8. 考察及び結論

ベピロビルセンの PK プロファイルを一連の in vivo 及び in vitro 試験により検討した。

マウスに 13 週間、カニクイザルに 13 及び 39 週間皮下投与した時の血漿中及び組織（腎臓及び肝臓）中のベピロビルセン濃度を測定した。

CByB6F1 WT マウスに皮下投与した時、試験 1 及び 91 日の Tmax の中央値は雌雄とも概ね投与後 0.5 時間であったが、例外として試験 91 日の 40 mg/kg/回群の雌では投与後 1 時間であった。全身曝露量（AUC）は用量依存的に増加し、性差は認められなかった。肝臓中濃度は雌雄で同程度であり、概して用量に比例して増加した。一方、腎臓中濃度は用量比を下回って増加し、雌マウスの腎臓曝露量はすべての用量で雄マウスより有意に高かった。

このクラスの他の ASO と同様に[Geary, 2015; Geary, 2015]、ベピロビルセンはカニクイザルの血漿から組織に速やかに分布した。最長 39 週間の単回及び反復皮下投与後の Tmax の中央値は 1～4 時間と推定された。Cmax 及び AUC は、静脈内投与（試験 1 週の負荷投与）及び 2～13 週までの皮下投与後に用量依存的に増加した。39 週間までの反復皮下投与試験では、Cmax は概して用量比をわずかに下回って増加した。AUC0-48 は単回投与後には用量に比例して増加したが、反復投与後には用量比を上回って増加した。腎臓及び肝臓中濃度は、すべての用量範囲で用量比を下回って増加した。

26 週間までの試験において、13 週間の休薬期間終了後、ベピロビルセンはサルの肝臓及び腎臓組織並びに高用量群のマウスの肝臓組織で定量された。肝臓及び腎臓で最も多く検出されたオリゴヌクレオチドはベピロビルセンであり、総オリゴヌクレオチドの 58～90%を占めた（総ピーク面積%に基づく）。

妊娠 CD-1 マウスを用いた受胎能及び発生に関する併合試験では胎児の肝臓で、妊娠 NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では胚及び胎児の肝臓で定量されなかったことから、ベピロビルセンは胚・胎児に移行しにくいことが示唆された。マウス PPND 試験では、乳汁中及び出生児肝臓中のベピロビルセンの曝露量はごくわずか（母動物肝臓中濃度の 1.0%未満）であったことから、乳汁を介したベピロビルセンの移行性は低いことが示された。

ベピロビルセンの高い血漿タンパク結合は、このクラスの他の ASO 分子と同様に親水性相互作用によるものであり、親和性が低く、非特異的であると考えられる。ベピロビルセンの血漿タンパク結合率はマウスで 91.6%超、サルで 98.3%超、ヒトで 94.9%超であった。

ベピロビルセンの酵素及びトランスポーターとの薬物相互作用に関する包括的な in vitro 評価の結果に基づき、相互作用を受ける又は相互作用を及ぼす可能性について検討した結果、臨床的に重大なリスクは認められなかった。

ベピロビルセンの代謝プロファイルは、非臨床動物種の肝臓組織及び臨床試験で患者から採取した血漿を用いて評価した。このクラスの他の ASO と同様に、ベピロビルセンは組織中でエンドヌクレアーゼ及びエキソヌクレアーゼにより加水分解されて不活性短鎖化代謝物に代謝された。

In vitro においては、マウス、ウサギ、サル及びヒト肝 S9 画分とベピロビルセンを 24 時間インキュベートした時、すべてのインキュベーション試料においてベピロビルセンが主要な薬物関連成分であり、代謝物は検出されなかった。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

他の ASO を用いた試験結果に基づくと[Geary, 2015]、ベピロビルセンは組織で代謝を受けて短鎖化代謝物となり、腎排泄を介して消失すると予想される。なお、健康被験者を対象とした第 1 相試験（213725 試験）において実施したベピロビルセンの尿中濃度測定について 2.7.2.3.3.5 に示す。

これまでに得られたベピロビルセンの体内動態データからベピロビルセンの薬物動態は十分に明らかにされており、ヒトにおける薬物動態プロファイル（2.7.2.3.1）はマウス、ウサギ及びサルと類似していることから、ベピロビルセンの毒性評価にこれらの非臨床動物種を使用することは妥当である。

これらのデータから、対象患者において予定用法・用量でベピロビルセンを安全に使用できると考えられる。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

表 10 ベピロビルセン皮下投与後の全身曝露量の比較評価

Species (Duration)	Dose (mg/kg/dose)	AUC_{0-48} (μg.h/mL)		Ratio of Animal to Human Exposure[c]	Cmax (μg/mL)		Ratio of Animal to Human Exposure
		Day 1	End of Study		Day 1	End of Study	
Mouse (CByB6F1 WT) (13 Weeks)[d] 2019N406770	4	5.64	7.43	0.08[e]	4.73	4.38	0.52[e]
	12	22.5	27.6	0.28[e]	16.0	13.9	1.66[e]
	40	**87.4**	**116**	**1.18[e]**	**52.8**	**42.2**	**5.03[e]**
Monkey (cynomolgus) (13 Weeks) 2019N417078	4[a]	72.0 [34.9-92.9]	65.4 [44.2-107]	0.67	40.5 [23.5-50.4]	11.4 [4.35-16.2]	1.36
	8[a]	**165 [137-184]**	**179 [141-259]**	**1.82**	**67.8 [57.7-82.7]**	**27.0 [16.4-37.1]**	**3.22**
	12[a]	231 [181-319]	309 [174-593]	3.15	119 [101-151]	34.4 [21.6-47.8]	4.10
	40[b]	848 [727-973]	1470 [750-1390]	14.97	80.7 [60.3-131]	61.8 [48.2-89.2]	7.37
Monkey (cynomolgus) (39 Weeks) 2019N419364	3	37.5 [26.2-77.3]	83.4 [29.7-159]	0.85	8.8 [5.3-19.8]	7.71 [3.6-12.6]	0.92
	6	**114 [85.5-167]**	**197 [74.7-306]**	**2.01**	**23.8 [17.6-41.6]**	**22.5 [9.8-41.4]**	**2.68**
	10	208 [170-270]	480 [190-1430]	4.89	28.9 [23.0-44.9]	31.1 [8.8-83.3]	3.71
	20	475 [335-587]	1240 [503-2900]	12.63	52.7 [43.0-63.1]	62.9 [40.9-99.9]	7.50
Human[c]	300	98.2		-	8.39		-

表 10 ベピロビルセン皮下投与後の全身曝露量の比較評価（続き）

Note: Numbers in brackets indicate [minimum-maximum] range.
Key:
a = Animals were dosed IV on Days 1, 3, 5, then weekly SC doses from Day 7 of Week 1 to Day 91 (Week 13).
b = Animals were dosed SC on Days 1, 3, 5, then weekly from Day 7 of Week 1 to Day 91 (Week 13). c = AUC0-168.
c = Plasma pharmacokinetics in chronic hepatitis B patients following administration of 300 mg total SC dose in clinical study modelling (data presented in IND122685 EOP2 meeting package, Oct 2022; clinical study 209668; see m2.5, Section 3.2 and Phase 2 Population PK report, Table 14, RPS- CLIN-113368).
d = Exposure values were derived from composite sampling with n=3/sex/dose at each timepoint.
e = Systemic exposures defined in the mouse are not being used to inform risk assessment as in general, rodents are more sensitive to the class-related pro-inflammatory effects of ASOs as compared to primates (including human) and therefore not considered an appropriate species for the calculation of systemic safety margins [Henry, 2008]. Bepirovirsen (also known as GSK3228836) is extensively distributed into the kidney and liver, and tissue concentrations are considered more important measures of drug distribution in rodents.
NOAEL = No observed adverse effect level (bolded)

9. 参考文献

Key Literature References

Bogdanos DP, Gao B, and Gershwin ME. (2013), Liver Immunology. Comprehensive Physiology, 3: 567-598. (This reference has not been originally included in m4.3 due to copy right clearance, however it will be provided with the final submission.)

Coutant DE, Boulton DW, Dahal UP, Deslandes A, Grimaldi C, Pereira J.N.S, Säll C, Sarvaiya H, Schiller H, Tai G, Umehara K, Yuan Y. and Dallas S. (2023), Therapeutic Protein Drug Interactions: A White Paper From the International Consortium for Innovation and Quality in Pharmaceutical Development. Clin Pharmacol Ther, 113: 1185-1198.

Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. Adv Drug Deliv Rev. 2015 Jun 29;87:46-51.

Geary RS, Baker BF, Crooke ST. Clinical and preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mipomersen (kynamro): a second-generation antisense oligonucleotide inhibitor of apolipoprotein B. Clin Pharmacokinet. 2015 Feb;54(2):133-46. (This reference has not been originally included in m4.3 due to copy right clearance, however it will be provided with the final submission.)

Han et al. A Randomized,Double-Blind, Placebo-Controlled, First-Time-in-Human Study to Assess the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Doses of GSK3389404 in Healthy Subjects. Clin Pharmacol Drug Dev. 2019 Mar 12;8(6):790–801.

Henry SP, Kim TW, Kramer-Stickland K, et al. Toxicologic properties of 2'-O- methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man. In Crooke ST, editor, Antisense Drug Technology, Principles, Strategies and Applications. Boca Raton, FL, Taylor & Francis Group, 2nd Ed 2008;2:327-64.

Hill AC, Hall J. A Randomized,Double-Blind, Placebo-Controlled, First-Time-in-Human Study to Assess the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Doses of GSK3389404 in Healthy Subjects. Helv. Chim. Ac. 2023, 106.

Kazmi F, Sensehauser C, Greway T. Characterization of the in vitro inhibitory potential of the oligonucleotide Imetelstat on human cytochrome P450 enzymes with predictions of in vivo drug-drug interactions. Drug Metab Dispos. 2019 Jan;47(1):9-14.

Post N, Yu R, Greenlee S, Gaus H, Hurh E, Matson J, Wang Y. Metabolism and Disposition of Volanesorsen, a 2'-O-(2 methoxyethyl) Antisense Oligonucleotide, Across Species. Drug Metab Dispos. 2019.

Ramsden D, Wu JT, Zerler B, Iqbal S, Jiang J, Clausen V et al. In vitro drug-drug interaction evaluation of GalNAc conjugated siRNAs against CYP450 enzymes and transporters. Drug Metab Dispos (2019).

Shemesh CS, Yu RZ, Gaus HJ, Greenlee S, Post N, Schmidt K et al. Elucidation of the Biotransformation Pathways of a Galnac$_3$-conjugated Antisense Oligonucleotide in Rats and Monkeys. Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2016; 5: e319

Yang, W. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism Quarterly Reviews of Biophysics 44, 1 (2011), pp. 1–93.

Yu RZ, Kim TW, Hong A, Watanabe TA, Gaus HJ & Geary RS. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B 100. Drug Metab Dispos. 2007; 35: 460-468

Yu RZ, Warren MS, Watanabe T, Nichols B, Jahic M, Huang J, et al. Lack of interactions between an antisense oligonucleotide with 2'-O-(2-methoxyethyl) modifications and major drug transporters. Nucleic Acid Ther 2016;26 (2):111-17.

United States Prescribing Information

BARACLUDE (entecavir) US prescribing Information, Dec. 2010;
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021797s011lbl.pdf

EPIVIR (lamivudine) US prescribing Information, Sept 2017;
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020564s37_020596s036lbl.pdf

HEPSERA (adefovir dipivoxil) US prescribing Information, Nov. 2012;
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021449s020lbl.pdf

Inotersen FDA Nonclinical Review, 2017. Available at:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/211172Orig1s000PharmR.pdf

Kynamro (Mipomersen) US Summary of Pharmacology Review. January 2013. Available at:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/203568Orig1s000PharmR.pdf

Tenofovir US prescribing Information, Oct. 2017,
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/pepfar/090049PI.pdf

Tyzeka (telbivudine) US prescribing Information, Jan. 2013;
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022011s013lbl.pdf

Volanesorsen EMA EPAR, 2019, at:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/waylivra-epar-publicassessment-report_en.pdf

Regulatory Guidelines (Not provided)

European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Investigation of Drug Interactions.

CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2, London, UK; 2013.

Food and Drug Administration (FDA). In Vitro Drug Interaction Studies - Cytochrome P450 Enzyme and Transporter Mediated Drug Interaction, Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Silver Spring, MD; 2020.

Food and Drug Administration (FDA). Clinical Pharmacology Considerations for the Development of Oligonucleotide Therapeutics Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Silver Spring, MD; 2022 (Draft).

ICH M12 on drug interaction studies. EMA, 2024.

PMDA (2018) Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information.

APPENDIX 1 ANALYTICAL METHODS USED FOR THE DETERMINATION OF BEPIROVIRSEN IN BIOLOGICAL FLUIDS AND TISSUES

Mouse assays

Three methods for the determination of bepirovirsen in mouse plasma have been validated using HPLC-MS/MS. Bepirovirsen was extracted from mouse plasma by protein precipitation using acetonitrile containing an isotopically labelled internal standard. Extracts were analysed by HPLC-MS/MS. A HPLC method has been developed for the determination of bepirovirsen in mouse tissues. The methods are selective, and summaries of the validation data are tabulated below.

	Report 2015N267536 (Method Reference GS32MPP)	Report 2018N385070 (Method Reference GS32MPP)	Report 2020N450119 (Method Reference GS38MPP)	Report 2019N419492 (Method Reference MT023S)
Calibration Model	Linear regression	Linear regression	Linear regression	Linear regression
Interface	Phenol chloroform extraction followed by liquid-liquid extraction / LC-MS/MS	Phenol chloroform extraction followed by liquid-liquid extraction / LC-MS/MS	Phenol chloroform extraction followed by liquid-liquid extraction / LC-MS/MS	HPLC
Validated Range	10 to 10000 ng/mL	10 to 10000 ng/mL	10 to 10000 ng/mL	10 to 1500 µg/g
Precision (%CV) within-assay	Precision (RSD%) values must be ≤15.0% (≤20.0% at the LLQ) and mean bias values must be within ± 15.0% (± 20.0% at the LLQ) bias of the nominal concentration for each QC sample within each run (intra-assay) and between runs (inter-assay). Minimum 5 data values generated at each QC sample concentration.		Precision (RSD%) values must be ≤15.0% (≤20.0% at the LLQ) and mean bias values must be within ± 15.0% (± 20.0% at the LLQ) bias of the nominal concentration for each QC sample within each run (intra-assay) and between runs (inter-assay).	1.4% to 6.0%
Precision (%CV) between-assay	As above (minimum 5 data values generated at each QC sample concentration)	Precision (RSD%) values were ≤15.0% and mean bias values	As above (minimum 5 data values generated at each QC sample concentration) and a minimum of 3	2.3 to 8.4%

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

	Report 2015N267536 (Method Reference GS32MPP)	Report 2018N385070 (Method Reference GS32MPP)	Report 2020N450119 (Method Reference GS38MPP)	Report 2019N419492 (Method Reference MT023S)
		were within ± 15.0% of the nominal concentration for each QC level	replicates must be within the bias acceptance criteria at each QC sample concentration.	
Accuracy (% bias)	>15%	±15%		92.7% to 100% (within assay) 95.3 to 100.9% (between assay)
Stability in Mouse Plasma	At least 24h at room temperature Up to 114 days when stored at -20°C	Up to 114 days when stored at -20°C and up to 458 days at -80°C.		
Freeze-thaw Stability	At least 4 cycles at nominal -80°C	At least 3 cycles at -20°C		6 cycles thawed at 37°C and stored at -80°C
Processed Extract Stability				72 hours at 5°C

Rabbit assay

An HPLC method has been developed for the determination of Bepirovirsen in rabbit tissue. Bepirovirsen was extracted from tissues by solid phase extraction. The method is selective, and summary of the qualification data are tabulated below.

	Report 2019N418875 (Method Reference UT023S)
Calibration Model	Linear regression
Interface (Detection Method)	HPLC
Validated Range	10 to 1500 µg/g
Precision (%CV) within-assay	LLQC: 2.1% LQC: 3.4% MQC: 0.8% HQC: 0.8%
Precision (%CV) between-assay	-
Accuracy (% bias)	LLQC: 96.3% LQC: 96.9% MQC: 100.6% HQC: 95.5%
Stability in Human Plasma	-
Freeze-thaw Stability	-
Processed Extract Stability	-

Key: LLQC = Lower Limit Quality Control Sample. LQC = Low Quality Control Sample. MQC = Medium Quality Control Sample. HQC = High Quality Control Sample.

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

Monkey Assays

Three methods for the determination of Bepirovirsen in monkey plasma have been validated using hybridization ELISA and ELISA methods. Bepirovirsen was extracted from monkey plasma by protein precipitation using acetonitrile containing an isotopically labelled internal standard. An HPLC method has been developed for the determination of bepirovirsen in monkey tissues. The methods are selective, and summaries of the validation data are tabulated below.

	Report 2015N264978 (Method Reference TLIAM-14217)	Report 2014N212900 (Method Reference TCAM-113)	Report 2019N419585 (Method Reference TCAM-083)	Report 2019N419216 (Method Reference NT023S)
Calibration Model	4 parameter logistic (4PL), $1/Y^2$ weighting factor	Four Parameter Curve Fit with weighting $1/Y^2$	Four Parameter Curve Fit with weighting $1/Y^2$	Linear regression
Interface (Detection Method)	Hybridization ELISA	Hybridization ELISA	ELISA	HPLC
Validated Range	1.00 to 160 ng/mL	1.0 to 160 ng/mL		10 to 1500 µg/g
Precision (%CV) within-assay	1.3% to 15.7%	1.9% to 5.9%	6.6% to 23.4%	1.0% to 4.2% (liver) 1.2% to 2.4% (kidney cortex)
Precision (%CV) between-assay	8.1% to 19.9%	4.1% to 9.0%	10.7 to 17.1	-
Accuracy (% bias)	-20.6% to 18.7% (within assay) -11.3% to -7.4% (between assay)	-4.8% to 2.0% (within assay) -2.5% to 12.7% (between assay)	-19.3% to 6.6%	97.3% to 102.6% (within assay, liver) 93.8% to 102.2% (within assay, kidney cortex)
Stability in Monkey Plasma	21 hours 31 minutes at room temperature	Not assessed	21 hours 31 minutes at Room Temperature	-
Freeze-thaw Stability	6 cycles when stored at -70°C (nominal)	Not assessed	6 Cycles frozen at -70 ±10°C and thawed at Room Temperature	-

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

	Report 2015N264978 (Method Reference TLIAM-14217)	Report 2014N212900 (Method Reference TCAM-113)	Report 2019N419585 (Method Reference TCAM-083)	Report 2019N419216 (Method Reference NT023S)
Processed Extract Stability	Not assessed	Not assessed	Not assessed	-

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

Method validation study for human samples can be found in m2.7.1, Summary of Biopharmaceutic Studies and Associated Analytical Methods for bepirovirsen.

APPENDIX 2 ADDITIONAL INFORMATION

The following reports have been reviewed within GlaxoSmithKline (GSK) and the information is considered to have no bearing on safety. These reports are not included in the study listing tables for the following reasons:

Table A1.1 List of Studies Conducted with Bepirovirsen that are not Included this Submission

Report No. (Study No.)	Title	Reason for Exclusion from Study Listing Tables
2019N419385 (505358-CS01BA01)	Hybridization ELISA analysis of ISIS 505358 in human plasma samples from ISIS Study 505358-CS1	Stability reports for formulations used in the nonclinical toxicology studies
2019N419629 505358-CS01BA02)	Hybridization ELISA analysis of ISIS 505358 in human urine samples from ISIS Study 505358-CS1	
FD2004/00028 (Z25089)	GSK3228836A: Analytical Method Validation of GSK3228836 Followed by Formulation Accuracy and Stability Assessment in0.9% (w/v) Aqueous Sodium Chloride	Performed to support use of the compound in different formulations

Studies listed in m2.6.4 comprise those conducted during the formal research and development of the compound. Any early screening studies completed on multiple compounds during the candidate selection phase and prior to in license of bepirovirsen have not been reviewed.

1. PHARMACOKINETICS: OVERVIEW FOR BEPIROVIRSEN

Table 1 Listing of Absorption Studies with Bepirovisen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose)	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
13 Week	Mouse (CByB6F1 WT)	18M/18F[f]	SC	0, 4, 12, 40[a]	13 weeks (Days 1 and 91)	Yes	[redacted]	2019N406770 (M71693G)	m4.2.3.2
13 Week[g]	Monkey (cynomolgus)	Up to 7M/7F	IV/SC SC	0, 4, 8, 12[c] 8[d], 40[c]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[e]	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
39 Week[h]	Monkey (cynomolgus)	Up to 7M/7F	SC	0, 3, 6, 10, 20[b]	39 weeks (Days 1 and 273)	Yes[e]	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

Note. All studies were conducted with bepirovirsen the parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358), unless noted otherwise. Studies listed comprise those conducted during the formal research and development of the compound.

Testing Facility:
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]

Key:
F = Female. IV = Intravenous. M = Male. SC = Subcutaneous. WT = Wild Type.
a = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13).
b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 (Week 3) to Day 273 (Week 39).
c = Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91.
d = Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7
e = Bepirovirsen analysis in tissue and/or plasma samples was conducted using a non-validated method and is therefore not considered to be GLP
f = PK parameters derived from composite sampling with n=3/sex/dose at each timepoint.
g = 13 week repeat dose study with 13-week recovery period.
h = 39 week repeat dose study with 26-week recovery period.

Table 2 Listing of Distribution Studies with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Predicted human steady state liver and kidney concentrations	Human in silico	NA	In silico	NA	NA	No	GSK	2020N447096	m4.2.2.3
PBPK modelling for plasma and tissues concentration-time profiles	Human in silico	NA	In silico	NA	NA	No	GSK	2024N562088	m4.2.2.3
Plasma protein binding	Mouse, monkey and human plasma	NA	In vitro	5, 150 µg/mL	NA	No	Ionis	2019N419183 (505358-IS03)	m4.2.2.3
Inhibitor and Substrate of BCRP, P-gp, MRP, MATE, and OAT, OCT, OATP	Human	NA	In vitro	Inhibition Assay: 0.046 to 100 µM 0.023 to 50.0 µM for OAT1 and OCT1 Substrate Assay 0.100, 1.00 and 10.0 µM	NA	No	[redacted]	2022N522434	m4.2.2.3
Distribution (liver)	Mouse (CD-1)	3M/3F[DRF] 12M/12F	SC	0, 500 to 2000	Single (24 and 48 hours)	Yes	[redacted]	2019N419174	m4.2.3.3.2

List of Distribution Studies Conducted with Bepirovirsen (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Distribution(Liver, kidney)	Mouse (CD-1)	11M+3M[TK]	SC	0, 40	4-weeks	No	GSK	2023N535316 (M73070N)	m4.2.3.2
Distribution (Liver, kidney and Placenta)[l]	Mouse (CD-1)	6M/6F	SC	0, 3, 15, 25	10 weeks (Day 71/male liver, GD 18/fetal and maternal liver, placenta)	Yes[h]	[redacted]	2017N337889 (505358-AS07)	m4.2.3.5.1
Distribution (Liver and kidney)[j]	Mouse (CD-1)	10M/10F +6M/6F[R]	SC	0, 4, 12, 40, 100[a]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[f,g]	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
Distribution (Liver and kidney)[j]	Mouse (CByB6F1 WT)	12M/12F +18M/18F[TK]	SC	0, 4, 12, 40[a]	13 weeks (Day 91)	Yes	[redacted]	2019N406770 (M71693G)	m4.2.3.2
Spatial Distribution (Liver and Kidney)[z]	Mouse (CD1)	6M/6F[TK]	SC	0, 12	13 Week	No	GSK	2021N494839 (X72475N)	m4.2.2.3
Distribution (Liver and kidney)[k]	Mouse (CD-1)	12M/12F+6M/6F[R]	SC	0, 3, 10, 30, 60[b]	26 weeks (Day 184)	Yes[f]	[redacted]	2019N419097 (505358-AS06)	m4.2.3.2
PPND	Mouse (CD-1)	24F+6F[TK]	SC	0, 3, 15, 25	GD 6 up to LD 21 (LDs 10 and 21)	Yes	[redacted]	2023N530614 (9002027)	m4.2.3.5.3
2-year (104 weeks) carcinogenicity	Mouse (CD-1)	70M+6M tissue analysis	SC	0, 3, 10, 30	104 weeks[#]	Yes	[redacted]	2021N489170 (8003091)	m4.2.3.4.1

List of Distribution Studies Conducted with Bepirovirsen (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Distribution (Placenta, maternal and fetal liver)[m]	Rabbit (NZW)	3F	SC	0, 6, 12.6, 25.2[c]	13 days (GDs 20 and 28)[c]	Yes[i]	[redacted]	2017N337736 (505358-AS08)	m4.2.3.5.2
Distribution (Liver and kidney)[n]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F+ 2M/2F[R]	IV/SC	0, 4, 8, 12[d]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
		3M/3F+2M/2F[R] 7M/7F[TK]	SC	0, 40[d]					
			SC	8[q]					
Distribution (Liver and kidney)[o]	Monkey (cynomolgus)	4M/4F 7M/7F	SC	0, 3, 6, 10, 20[b]	39 weeks (Days 86, 113, 240 241, 258, 275, 354, 455)	Yes[i]	[redacted]	2019N419364 (505358-AS05)	m4.2.3.2

List of Distribution Studies Conducted with Bepirovirsen (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./ Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/dose) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Note: Bepirovirsen the parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) has been used in all studies unless otherwise noted. **Key:** BCRP = breast cancer resistance protein. DRF = Dose Range Finding. GD = Gestation Day. IV: Intravenous. LD: Lactation Day. MRP: multidrug resistance associated protein. MATE: Multidrug and Toxin Extrusion Transporter. NA = Not applicable; NZW = New Zealand White. OAT: organic anion transporter. OCT1: organic cations transporter. P-gp: P-glycoprotein multidrug transporter. R = Recovery; SC = Subcutaneous. TK = Toxicokinetic. WT = Wild Type. a = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13). b = Animals dosed on Days 1, 5, 10 and 14, then weekly from Day 21 (Week 3) to Day 273 (Week 39). c = Animals dosed on Gestation Day (GD) 6, GD 8, GD 10, GD 12, GD 14, GD 16 and GD 18. d =Bepirovirsen was administered to the 4, 8 and 12 mg/kg/dose groups on Days 1, 3, and 5 by IV (1 hour infusion), then SC once weekly on Day 7 through Day 91. Bepirovirsen was SC administered to the 40 mg/kg/dose group on Days 1, 3, and 5, then SC once weekly on Day 7 through Day 91. e =Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7. f = The analysis of bepirovirsen in kidney samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. g = The evaluation of samples from the 100 mg/kg group for the presence of metabolites was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. h = The analysis of bepirovirsen in placentae samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP. i = Bepirovirsen analysis in tissue and/or plasma samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.							**Testing Facility:** [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted] GSK = GSK [redacted] = [redacted] Ionis = Ionis Pharmaceuticals, Inc. (formerly known as ISIS Pharmaceuticals) [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted] [redacted] = [redacted]		

List of Distribution Studies Conducted with Bepirovirsen (Continued)

Key:
j = Samples from a 13-week toxicology study in mice.
k = Samples from a 26-week toxicology study in mice.
l = Samples from a mouse combined fertility and development study.
m = Samples from a rabbit embryofetal development study.
n = Samples from a 13-week toxicology study in monkeys.
o = Samples from a 39-week toxicology study in monkeys.
q= Bepirovirsen was SC administered to the TK group at 8 mg/kg/dose on Days 1, 3, 5, and 7.
z = Details of the in-life phase are included in Study Number 20317070 (GSK Report 2021N488385). Data from GSK Report 2021N488385 was used to model.
# = SC injection/ once a day on Days 1, 4, 8, and 11 then once weekly starting Day 15.

Table 3 Listing of Metabolism Studies with Bepirovirsen

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location
Mechanistic Static Model	CYP family enzymes	NA	In silico	NA	NA	No	GSK	2023N526136	m4.2.2.4
Metabolism	Mouse, Rabbit, Monkey, Human S9 liver fractions	NA	In vitro	20 µM	24h	No	GSK	2024N562723 (24DMS001)	m4.2.2.4
Induction of CYP450 1A2, 2B6 and 3A4	human hepatocytes	NA	In vitro	0.01-200 µM	NA	No	GSK	2022N522535 (22DMM045)	m4.2.2.4
Inhibitor of CYP450 and glucuronosyltransferase	human hepatocytes	NA	In vitro	Up to 100 µM	NA	No	[redacted]	2022N522533 (XT225122)	m4.2.2.4
Metabolism (Liver and Kidney)[f]	Mouse (CD-1)	6M/6F	SC	0, 4, 12, 40, 100[a]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[d,e]	[redacted]	2019N417087 (505358-AS01)	m4.2.3.2
Metabolism (Liver and Kidney)[g]	Monkey (cynomolgus)	3M/3F2M/2F[R] 3M/3F+2M/2F[R] 7M/7F	IV/SC SC SC	0, 4, 8, 12 40[b] 8[c]	13 weeks (Days 93 and 182)	Yes[d,e]	[redacted]	2019N417078 (505358-AS02)	m4.2.3.2
Metabolism (plasma)	Human	25 subjects per pool	SC	300[h]	24 week	No	[redacted]	2025N567431	m4.2.2.4

List of Metabolism Studies with Bepirovirsen (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location

Note: All studies have been conducted with Bepirovirsen parent form (also known as GSK3228836 and ISIS 505358) unless otherwise noted**.**
Key: Cytochrome P450 Enzymes. IV = Intravenous; NA = not applicable; R = Recovery; SC = Subcutaneous.
a = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7, then weekly from Day 14 (Week 2) to Day 91 (Week 13).
b = Animals were dosed IV or SC on Days 1, 3, 5, then weekly SC doses from Day 7 (Week 1) to Day 91 (Week 13).
c = Animals dosed on Days 1, 3, 5 and 7 only.
d = The analysis of GSK3228836 in kidney samples was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.
e = Sample evaluation from the 100 mg/kg group for the presence of metabolites was conducted using a nonvalidated method and is therefore not considered to be GLP.
f = Samples from a 13-week toxicology study in mice.
g = Samples from a 13-week toxicology study in monkeys
h = plasma pooled from week 24 plasma PK samples from 25 individuals (study number 202009, see also m2.7.2, Section 3 and m2.5 for additional information on the clinical study)

Testing Facility:
GSK = GSK
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]
[redacted] = [redacted]

Table 4 Listing of Excretion Studies with Bepirovirsen

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen.

Table 5 Listing of Pharmacokinetic Drug-Drug Interaction Studies Performed with Bepirovirsen

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen.

Table 6 Listing of Other Pharmacokinetic Studies Performed with Bepirovirsen

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen.

2. ANALYTICAL METHODS AND VALIDATION REPORTS

Table 7 Pharmacokinetics: Analytical Methods and Validation Reports

Type of Study	Species	Quantification Limits	Report No. (Method Reference)	Location
Validation of an HPLC method for the determination of ISIS 505358 in mouse tissue	Mouse	10 to 1500 µg/g	2019N419492 (MT023S)	m4.2.2.1
Validation of a method for the determination of GSK3389404 and GSK3228836 in mouse plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (LC-MS/MS)	Mouse	0.01 to 10 µg/mL	2015N267536 (GS32MPP)	m4.2.2.1
Validation of a method for the determination of GSK3389404 and GSK3228836 in mouse plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (LC-MS/MS) - Addendum to final validation report 1	Mouse	0.01 to 10 µg/mL	2018N385070 (GS32MPP)	m4.2.2.1
Validation of a Method for the Determination of GSK3228836 in Mouse Plasma by HPLC with MS/MS Detection	Mouse	0.01 to 10 µg/mL	2020N450119 (GS38MPP)	m4.2.2.1
Qualification of an HPLC method for determination of ISIS 505358 in rabbit tissue	Rabbit	10 to 1500 µg/g	2019N418875 (UT023S)	m4.2.2.1
Partial validation of a hybridization ELISA method for the determination of ISIS 505358 in cynomolgus K2EDTA plasma	Monkey	0.001 to 0.160 µg/mL	2015N264978 (TLIAM-14217)	m4.2.2.1

Pharmacokinetics: Analytical Methods and Validation Reports (Continued)

Type of Study	Species	Quantification Limits	Report No. (Method Reference)	Location
Partial validation of a hybridization ELISA method for the determination of ISIS 505358 in cynomolgus plasma	Monkey	0.0005 to 0.160 µg/mL	2014N212900 (TCAM-113)	m4.2.2.1
Validation of a hybridization ELISA method for the determination of ISIS 505358 in monkey plasma	Monkey	0.0005 to 0.160 µg/mL	2019N419585 (TCAM-083)	m4.2.2.1
Qualification of an HPLC method for the determination of ISIS 505358 in cynomolgus monkey tissue	Monkey	10 to 1500 µg/g	2019N419216 (NT023S)	m4.2.2.1

Key:
ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay. HPLC = High performance liquid chromatography. K2EDTA = Dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid. LC-MS/MS = Liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

3. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER A SINGLE DOSE

Table 8 Pharmacokinetics: Absorption in Monkey After Single Dose

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Report No. 2019N417078
Study No.: 505358-AS02
Location in CTD: m4.2.3.2

Species	Monkey (cynomolgus)				
Feeding Condition	Fed				
Vehicle/Formulation	0.9% Sodium Chloride				
Analyte	bepirovirsen				
Sample	Plasma				
Assay	Hybridization ELISA				
Method of Administration	IV 1-Hour Infusion			SC	
Gender (M/F)/ No. of Animals	3M/3F	3M/3F	5M/5F	5M/5F	7M/7F
Dose (mg/kg)	4	8	12	40	8
PK Parameters (Mean ± SD)					
Tmax (hr)[a]	1.0 (1.0, 1.0)	1.0 (1.0, 1.0)	1.0 (1.0, 1.0)	3.0 (2.0, 8.0)	1.0 (1.0, 4.0)
Cmax (µg/mL)	40.5 ± 9.53	67.8 ± 8.38	119 ± 16.6	80.7 ± 20.8	27.2 ± 8.02
AUC(0-48hr) (µg*hr /mL)	72.0 ± 20.3	165 ± 17.1	231 ± 42.1	848 ± 94.4	140 ± 27.5
MRT0-48hr (hr)	1.67 ± 0.115	1.62 ± 0.154	1.74 ± 0.185	7.94 ± 0.753	4.85 ± 0.548
CLp(0-48hr) or CLp/F0-48hr (mL/hr/kg)[b]	61.3 ± 26.4	48.9 ± 5.41	53.1 ± 8.67	47.6 ± 5.32	59.5 ± 16.0

Key:
a = Median (min, max); b = CLp/F0-48hr = [Dose (mg) / AUC0-48hr (hr*µg/mL)] x 1000
AUC = Area Under the Curve; CL = Clearance; Cmax = Maximum observed plasma drug concentration; ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; F = Female; IV = Intravenous; M = Male; MRT = Mean Residence Time; PK = Pharmacokinetics; SC = Subcutaneous; SD = Standard Deviation; Tmax = Time at which Cmax occurred.

4. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER REPEATED DOSES

Table 9 Pharmacokinetics: Absorption in Mouse After Repeated Dose

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.3.2
Report No.: 2019N406770
Study No.: M71693G

Species (Strain):	Mouse (CByB6F1 WT)
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline
Method of Administration:	SC
Sample:	Plasma
Analyte:	bepirovirsen
Assay:	HPLC-MS/MS
Duration of dosing (days):	13 week
Gender (M/F)/Number of Animals:	
Main	12M/12F;
Toxicokinetic	18M/18F
Duration of dosing (days):	13 week

		Male				Female			
Dose (mg/kg/dose)		**0**	**4**	**12**	**40**	**0**	**4**	**12**	**40**
AUC(0-t) (µg*h/mL)	Day 1	NC	6.31	24.2	91.5	NC	4.73	20.6	82.9
	Day 91	NC	7.68	29.4	132	NC	6.86	25.8	102
Cmax (µg/mL)	Day 1	NC	4.65	18.1	54.4	NC	4.82	13.9	51.3
	Day 91	NC	3.70	15.2	47.2	NC	5.06	12.7	40.7

Note. Data relating to bepirovirsen tissue concentrations in the kidney and liver were also evaluated in this study and are summarized in Table 17 .
Key:
AUC = Area Under the Curve. Cmax = Maximum observed plasma drug concentration. F = Female. HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. M = Male. NC = Not Calculated. SC: subcutaneous. WT: Wild Type.

Table 10 Pharmacokinetics: Absorption in Monkey After Repeated Dose

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.3.2
Report No.: 2019N417078; **Study No.:** 505358-AS02

Species	Monkey (cynomolgus)				
Feeding Condition	Fed				
Vehicle / Formulation	0.9% Sodium Chloride				
Analyte	bepirovirsen				
Sample	Plasma				
Assay	Hybridization ELISA				
Method of Administration	SC				
Profile Day	7, 91				
Dose Frequency					
Load		Days 1, 3, 5;			NA
Maintenance		q1w x 13 weeks beginning on Day 7			Days 1, 3, 5, 7
Dose Group	2	3	4	5	6
Dose (mg/kg)	4	8	12	40	8
Number of Doses	16	16	16	16	4
No. of Animals/Gender (M/F)	3M/3F	3M/3F	4M/5F	5M/5F	6M/6F
PK Parameters					
Tmax (hr)[b]	2.0 (1.0, 4.0)	2.0 (2.0, 4.0)	4.0 (2.0, 4.0)	4.0 (2.0, 8.0)	2.0 (0.5, 2.0)
Cmax (µg/mL)	11.4±5.05	27.0±7.58	34.4±9.41	61.8±10.7	21.4±2.70
AUC0-48hr (hr*µg/mL)	65.4±23.0	179±45.0	309±132	1470±757	128±24.6
MRT0-48hr (hr)	6.84±1.88	6.80±2.28	7.86±2.52	11.1±1.44	5.33±0.674
$t_{1/2\lambda z}$ (days)	NA	NA	43.3[d]	21.9[e] ± 0.0356	10.6[f]
CLp(0-48hr) or CLp/F0-48hr (mL/hr/kg)[c]	64.5±20.0	45.7±10.6	43.0±14.7	41.1±8.56	63.5±12.3

Key:
a= Loading doses administered via IV 1-hour infusion. b = Median (min, max); c = CLp/F0-48hr = [Dose (mg) / AUC0-48hr (hr*µg/mL)] x 1000; d = Denotes only 1 animal with an R2 > 0.7 for terminal half-life calculation.; e = Denotes only 2 animals with an R2 > 0.7 for terminal half-life calculation ;f = Terminal half-life value constructed from a composite mean.
AUC = Area Under the Curve; CL = Clearance; Cmax = Maximum observed plasma drug concentration; ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; F = Female; IV = Intravenous; M = Male; MRT = Mean Residence Time; NA = Not Applicable; q1w = Once Weekly; SC = Subcutaneous; ± = SD = Standard Deviation; $t_{1/2\lambda z}$ = Terminal Elimination time.

Table 11 Pharmacokinetics: Absorption in Monkey After Repeated Dose

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.3.2
Report No.: 2019N419364
Study No.: 505358-AS05

Species (Strain):		Monkey (cynomolgus)									
Vehicle/Formulation:		0.9% w/v saline									
Method of Administration:		SC									
Sample:		Plasma									
Analyte:		bepirovirsen									
Assay:		Hybridization ELISA									
Duration of dosing (days):		39 weeks									
		Male					**Female**				
Dose (mg/kg/dose)		0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Number of Animals:	**Day 1**	6	4	4	7	7	6	4	4	7	7
	Day 273	6	4	4	7	4	6	3	4	7	4
PK Parameters											
AUC(last) (ng*h/mL)	**Day 1**	NC	45500	130000	220000	516000	NC	29400	97500	196000	434000
	Day 273	NC	97900	204000	470000	1860000	NC	64100	190000	491000	626000
Cmax (ng/mL)	**Day 1**	NC	10400	27300	29300	51100	NC	7190	20300	28500	54200
	Day 273	NC	8640	22800	24600	79700	NC	6470	22300	37600	46100
Tmax (h)	**Day 1**	NC	1.75	2.00	2.86	2.86	NC	1.75	2.00	2.57	2.00
	Day 273	NC	2.25	2.50	6.29	5.50	NC	2.33	2.50	3.43	3.50

Note. Data relating to bepirovirsen tissue concentrations in the kidney and liver were also evaluated in this study and are summarized in Table 21
Key:
Cmax = Maximum observed plasma drug concentration. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. F: Female. M: Male. NC = Not calculated.SC: subcutaneous. Tmax = Time at which Cmax occurred.

5. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION

Table 12 Pharmacokinetics: Predicted Human Steady State Liver Concentrations by Allometric Scaling

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.3.2
Report No.: 2020N447096

Species (Strain):	Monkey (cynomolgus)
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline
Method of Administration:	SC
Sample:	Liver and Kidney
Analyte:	bepirovirsen
Assay:	Hybridization ELISA[a]
Gender (M/F)/Number of Animals:	Up to 6M/6F
Duration of dosing (days):	13 weeks, 39 weeks

Tissue:	Dose (mg/kg)	Dose/monkey (mg)[a]	Bepirovirsen concentration in tissue (µg/g)	Dose Normalized (µg/g*mg)	Average DN monkey kidney concentration (µg/g*mg)	Extrapolated DN human kidney concentration (µg/g*mg)	Predicted human kidney concentrations (µg/g)
Liver	4	16	241	15.1	13.9	0.85	128 (150mg bepirovirsen dose) 256 (300 mg bepirovirsen dose)
	8	32	467	14.6			
	12	48	581	12.1			
	3	12	191	15.9			
	6	24	353	14.7			
	10	40	441	11.0			
Kidney	4	16	420	26.3	24.2	0.86	129 (150 mg Bepirovirsen dose) 259 (300 mg Bepirovirsen dose)
	8	32	623	19.5			
	12	48	1020	21.3			
	3	12	314	26.2			
	6	24	709	29.5			
	10	40	911	22.8			

Note: Liver and kidney tissue concentrations from the 13 week repeat dose study in cynomolgus monkeys (Report 2019N417078, m4.2.3.2; m2.6.7, Table 17)
Key:
a = based on a monkey bodyweight of 4 kg
DN = Dose normalized. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. F: Female. M: Male. SC: subcutaneous.

Table 13 PBPK Modelling in Prediction of Plasma, Liver and Kidney Concentration-Time Profile

Location in CTD: m4.2.2.3
Report No.: 2024N562088

Study System	SimCYP Simulator (v24)
Objectives	Development of a PBPK model for bepirovirsen to predict the systemic PK, liver and kidney tissue concentration-time profiles in humans after single and multiple SC doses. Simulate and verify plasma concentration-time profile and PK parameters in patients with chronic hepatitis B and moderate hepatic impairment.
Reference Clinical Studies (model verification)	Study 213725 (ISIS 505358-CS1): Single and multiple ascending doses Study 205695 (ISIS 505358-CS3): Multiple ascending doses Study 205871 (B-Assured): Single dose
Nonclinical Tissue concentration data	Liver and kidney concentrations derived from 13 and 39 week repeat dose toxicity studies in cynomolgus monkeys (Reports 2019N417078 and 2019N419364, m4.2.3.2) Hepatic and renal partition coefficient ratios corrected for the unbound plasma concentration fractions in monkey fu = 0.0058 and humans fu = 0.0099
Predicted partition coefficient	
Kidney	2955
Liver	2147

PK Parameters and Tissue Concentration	**Estimated concentrations and elimination half life following a 300 single dose to healthy participants**			
	Plasma		**Liver**	**Kidney**
	Predicted	**Observed**	**Predicted**	**Predicted**
Cmax (µg/mL)	-	-	172	132
Elimination half life (days)	27.77	24	37	-

Plasma	**Healthy Participants 300 mg Single Dose (B-Assured)**		**Moderate Hepatic Impairment 300 mg Single Dose (Sim-Hepatic Impairment Child Pugh B; B-Assured; CS-3)**	
	Predicted	**Observed**	**Predicted**	**Observed**
Clearance (L/h)	2.25	2.94	2.72	4.19
AUC0-inf (µg.h/mL)	123.51	114.43	115.43	78.72
Cmax (µg/mL)	7.85	10.56	7.11	7.60

Key:
AUC = Area Under the Curve; Cmax = Maximum observed plasma drug concentration; fu = unbound plasma concentration fraction.

Table 14 Pharmacokinetics: Organ Distribution Concentrations in Mouse After Single Dose

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.3.3.2
Report No.: 2019N419174
Study No.: -

Species (Strain):	CD-1 Mouse
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline
Method of Administration:	SC
Sample:	Liver
Analyte:	bepirovirsen
Assay:	HPLC-UV
Gender (M/F)/Number of Animals:	12M/12F
Duration of dosing (days):	Single dose

Mean Bepirovirsen Concentrations in the Liver (µg/g)							
24 hours post dose				**48 hours post dose**			
0 (vehicle control)	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg	0 (vehicle control)	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
BLQ	307.6	402.1	479.7	BLQ	307.1	444.0	535.4

Key:
BLQ = Below Limit of Quantification. F= Female. HPLC-UV = High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detector. M = Male. SC = subcutaneous. - = not applicable.

Table 15 Pharmacokinetics: Organ Distribution in Mouse After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.2.3
Report No.: 2023N535316 (liver and kidney tissue analysis)
Study No.: M73070N

Species (Strain):	Mouse (CD-1)
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline
Method of Administration:	SC
Sample:	Kidney and Liver
Analyte:	Bepirovirsen
Assay:	HPLC-MS/MS
Gender (M/F)/Number of Animals:	3M
Duration of dosing (days):	4 weeks (Day 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28)

		Bepirovirsen Concentration (µg/g)	
		Male	
		0 mg/kg/dose (vehicle)	**40 mg/kg/dose**
Liver			
	Day 30	-	217
Kidney			
	Day 30	-	126

Key:
HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry M: Male. SC: subcutaneous.
Note: Bepirovirsen concentrations were determined in the liver and kidney from mice in Group 7 of M73070N with an assay used in previous toxicology studies. Because the aim of this study was to characterize batches from alternative manufacturing, designated GSK4421747, this is the compound descriptor used in the tissue concentration report.

Table 16 Pharmacokinetics: Organ Distribution in Mouse After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.2.3
Report No.: 2021N488385 (liver and kidney tissue analysis) and 2021N494839 (ISH immunohistochemical analysis, tissue distribution)
Study No.: M72229G and X72475N

Species (Strain):	Mouse (CD-1)
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline
Method of Administration:	SC
Sample:	Kidney and Liver
Analyte:	Bepirovirsen
Assay:	Label-free ISH combined with IHC
Gender (M/F)/Number of Animals:	6M/6F
Duration of dosing (days):	13 weeks
ISH IHC Analysis (Report: 2021N494839, m4.2.2.3)	Spatial distribution of bepirovirsen in the liver and kidney samples from CD1 mice was primarily the non-parenchymal cells and the proximal tubules respectively. Liver distribution was in line with previously published data showing the vast majority of modified ASOs being distributed in the non-parenchymal population.

		Bepirovirsen Concentration (ng/g)			
		Male		**Female**	
		0 mg/kg/dose (vehicle)	**12 mg/kg/dose**	**0 mg/kg/dose(vehicle)**	**12 mg/kg/dose**
Kidney					
	Day 92	<50.0	70000	<50.0	198000
Liver					
	Day 92	<50.0	48800	<50.0	42900

Key:
F: Female. HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. IHC: Immunohistochemistry. ISH: In Situ Hybridization. M: Male. SC: subcutaneous.

Table 17 Pharmacokinetics: Organ Distribution in Mouse After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.3.2
Report No.: 2019N417087
Study No.: 505358-AS01

Species (Strain):	Mouse (CD-1)				
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline				
Method of Administration:	SC				
Sample:	Kidney and Liver				
Analyte:	Bepirovirsen (				
Assay:	HPLC-MS/MS				
Duration of dosing:	13 weeks				
Dose (mg/kg/week)[a]:	**0 (Control)**	**4**	**12**	**40**	**100**
Tissue oligonucleotide concentration (µg/g)					
Number Evaluated[b]:	NA	6M/6F	6M/6F	6M/6F	6M/6F
Liver					
Day 93	NA	16.2 ± 7.92	57.7 ± 13.8	192 ± 55.6	381 ± 111
Day 182	NA	NA	BLQ	NA	2.54 ± 6.25
Kidney					
Day 93	NA	45.7 ± 14.4	95.8 ± 47.2	125 ± 57.5	299 ± 215
Day 182	NA	NA	BLQ	NA	BLQ

Key:
BLQ = Below Limit of Quantification. F = Female. HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography. M = Male. NA = Not Applicable. SC = subcutaneous.
a The loading dose during the first week was expressed as mg/kg/dose, while the maintenance doses for Weeks 2 to 13 were expressed as mg/kg/week. The animals were dosed on Days 1, 3, 5, and 7, and then once weekly thereafter through Day 91.
b Tissue samples were collected from the first 6 study animals/sex/group from all groups during necropsy on Days 93 and 182. No samples from the control group were analyzed. Results are presented as combined gender values.

Table 18 Pharmacokinetics: Organ Distribution in Mouse After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Location in CTD: m4.2.3.2
Report No.: 2019N406770
Study No.: M71693G

Species (Strain):		Mouse (CByB6F1 WT)							
Vehicle/Formulation:		0.9% w/v saline							
Method of Administration:		SC							
Sample:		Liver and Kidney							
Analyte:		Bepirovirsen							
Assay:		HPLC-MS/MS							
Gender (M/F)/Number of Animals:		12M/12F (main) + 18M/18F[TK]							
Duration of dosing :		13 weeks							
		Male				**Female**			
Dose (mg/kg/dose)[a]		0	4	12	40	0	4	12	40
Concentrations of GSK3228836 in liver and kidney (µg/g)									
Kidney									
	Day 93	BLQ	67.4	94.4	168	BLQ	103	223	377
Liver									
	Day 93	BLQ	30	119	251	BLQ	28.2	136	213

Key:
BLQ: Below Limit of Quantification. F: Female. HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. M: Male. SC: subcutaneous. TK: toxicokinetic. WT: Wild Type.
a Doses are expressed in terms of GSK3228836. Animals received GSK3228836 via subcutaneous injection on Days 1, 3, 5 and 7 and then once weekly thereafter through Day 91 (for a total of 16 doses).

Table 19 Pharmacokinetics: Organ Distribution in Mouse After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Report No.: 2019N419097
Study No.: 505358-AS06
Location in CTD: m4.2.3.2

Species (Strain):	Mouse (CD-1)									
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline									
Method of Administration:	SC									
Sample:	Liver and Kidney									
Analyte:	Bepirovirsen									
Assay:	HPLC-MS/MS									
Gender (M/F)/Number of Animals:	12M/12F (main) + 6M/6F (recovery: vehicle, 10mg/kg/dose and 60mg/kg/dose groups)									
Duration of dosing:	26 weeks									
			Male					**Female**		
Dose[a] (mg/kg/week)	0	3	10	30	60	0	3	10	30	60
Numbers of Animals:										
Main	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Recovery (13 weeks)-	6	-	6	-	6	6	-	6	-	6
Kidney (µg/g)										
Main – Day 184	-	31.7	58.4	89.9	134	-	38.1	131	215	470
Recovery – Day 273	-	-	-	BLQ	BLQ	-	-	-	BLQ	BLQ
Liver (µg/g)										
Main – Day 184	-	9.50	68.3	183	315	-	9.33	40.1	113	221
Recovery – Day 273	-	-	-	BLQ	9.02	-	-	-	BLQ	BLQ

Key:
BLQ: Below Limit of Quantification. F: Female. HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. M: Male. SC: subcutaneous.
a = The vehicle control and test article were given via subcutaneous injections twice weekly through Day 14 (once per day on Days 1, 5, 10 and 14) and then once weekly thereafter through Day 184 terminal necropsy. The loading doses during the first two weeks were expressed as mg/kg/dose, while the maintenance doses through the Day 182 terminal necropsy were expressed as mg/kg/week.

Table 20 Pharmacokinetics: Organ Distribution in Mouse After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Report No.: 2021N489170
Study No.: 8003091; GSK Reference No.: M72326G
Location in CTD: m4.2.3.4.1

Species (Strain):		Mouse (CD-1)							
Vehicle/Formulation:		0.9% w/v saline							
Method of Administration:		SC							
Sample:		Liver and Kidney							
Analyte:		Bepirovirsen							
Assay:		HPLC-MS/MS							
Gender (M/F)/Number of Animals:		70M/F+6M/F tissue analysis							
Duration of dosing :		104 weeks							
			Male				**Female**		
Dose (mg/kg/dose)[a]		0	3	10	30	0	3	10	30
Numbers of Animals:									
	Main	70	70	70	70	70	70	70	70
	Tissue Analysis	6	6	6	6	6	6	6	6
GSK3228836 Concentration (ng/g)									
Kidney									
	Day 92	NQ	28.2	76.7	85.7	NQ	44.9	147	229
Liver									
	Day 92	NQ	14.4	43.6	161	NQ	14.4	43.6	121

Key:
F = Female. HPLC-MS/MS = High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. M = Male. NQ = Not Quantified.

Table 21 Pharmacokinetics: Organ Distribution in Monkey After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Report No.: 2019N417078 **Study No.:** 505358-AS02 Location in CTD: m4.2.3.2

Species	Monkey (cynomolgus)												
Feeding Condition	Fed twice daily												
Vehicle Formulation	0.9% w/v saline												
Analyte/Assay	Bepirovirsen												
Data Analysis Software	Phoenix WinNonlin, Version 6.3												
Method of Administration	SC												
Numbers of Animals:					**Male**						**Female**		
Main	3	3	3	3	3	7	3	3	3	3	3	7	
Recovery	2	0	0	2	2	0	2	0	0	2	2	0	
Dose (mg/kg/week)[a]	0	4	8	12[b]	40	8	0	4	8	12	40	8	
	Bepirovirsen oligonucleotide concentration (µg/g)												
Kidney cortex													
Day 3	-	-	-	-	-	289[c]	-	-	-	-	-	323[c]	
Day 9	-	-	-	-	-	1240[c]	-	-	-	-	-	816[c]	
Day 16	-	-	-	-	-	439[c]	-	-	-	-	-	252[c]	
Day 23	-	-	-	-	-	373[c]	-	-	-	-	-	408[c]	
Day 30	-	-	-	-	-	268[c]	-	-	-	-	-	59.5[c]	
Day 44	-	-	-	-	-	34.4[c]	-	-	-	-	-	38.6[c]	
Day 58	-	-	-	-	-	14.1[c]	-	-	-	-	-	119[c]	
Main – Day 93	-	371	633	1060	2260	-	-	468	614	986	2210	-	
Recovery – Day 182	-	-	-	17.1[c]	56.6	-	-	-	-	14.6	31.6	-	

Pharmacokinetics: Organ Distribution Concentrations in Monkey Toxicokinetic Group After Single and Repeat Doses (Continued)

Numbers of Animals:	Male						Female					
Main	3	3	3	3	3	7	3	3	3	3	3	7
Recovery	2	0	0	2	2	0	2	0	0	2	2	0
Dose (mg/kg/week)[a]	0	4	8	12[b]	40	8	0	4	8	12	40	8
	Bepirovirsen oligonucleotide concentration (µg/g)											
Liver												
Day 3	-	-	-	-	-	89.8[c]	-	-	-	-	-	105[c]
Day 9	-	-	-	-	-	312[c]	-	-	-	-	-	313[c]
Day 16	-	-	-	-	-	134[c]	-	-	-	-	-	270[c]
Day 23	-	-	-	-	-	97.6[c]	-	-	-	-	-	112[c]
Day 30	-	-	-	-	-	96.3[c]	-	-	-	-	-	50.6[c]
Day 44	-	-	-	-	-	11.4[c]	-	-	-	-	-	17.4[c]
Day 58	-	-	-	-	-	0.00[c]	-	-	-	-	-	16.3[c]
Main - Day 93	-	217	453	603	982	-	-	265	481	559	1100	-
Recovery - Day 182	-	-	-	54.9[c]	69.0	-	-	-	-	11.7	15.0	-

Comparison of Tissue and Plasma Exposure	AUC2-51days (µg*hr/g or µg*hr/mL)[d]	Ratio	$t_{1/2\lambda z}$ (days)
Plasma	26.2	1	10.6
Kidney Cortex	275000	10500	13.3
Liver	103000	3920	8.69

Key:
a = Groups 1 to 4: the vehicle control and test article were given via intravenous infusion (1 hour/day) once per day on Days 1, 3, 5 and 7, and then once weekly via subcutaneous injection thereafter through Day 91. Group 5: the test article was given via subcutaneous injection once per day on Days 1, 3, 5 and 7, and then once weekly through Day 91. Group 6: the test article was given via subcutaneous injection once per day on Days 1, 3, 5 and 7, with one animal/sex necropsied on Days 3 (prior to dosing), 9, 16, 23, 30, 44, and 58. The loading doses during the first two weeks were expressed as mg/kg, while the maintenance doses through Day 91 are expressed as mg/kg/week.
b = In male no. 40, given 12 mg/kg/week, a pronounced reduction in platelets was first observed on Day 65, associated with an increase in the mean platelet volume. Dosing was discontinued for this animal after Day 63. The animal remained on study until the end of the recovery period (Day 182).
c = n=1
d = $AUC_{2\text{-}51days}$ is area under the curve from 2 to 51 days after the last SC dose given on Day 7 (Day 9 – Day 58). Ratio of matrix $AUC_{2\text{-}51days}$ values calculated as [Tissue/Plasma].
AUC = Area Under the Curve. HPLC = High Performance Liquid Chromatography. t1/2λz = Terminal Elimination Time. - = Not Determined.

Table 22 Pharmacokinetics: Organ Distribution Concentrations in Monkey Toxicology Group After Repeat Doses

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Report No.: 2019N419364
Study No.: 505358-AS05
Location in CTD: m4.2.3.2

Species (Strain):		Monkey (cynomolgus)									
Vehicle/Formulation:		0.9% w/v saline									
Method of Administration:		SC									
Sample:		Liver and Kidney									
Analyte:		Bepirovirsen									
Assay:		HPLC-MS/MS									
Gender (M/F)/Number of Animals:		28M/28F									
Duration of dosing (days):		39 weeks									
				Male					**Female**		
Dose (mg/kg/week)[a]		0	3	6	10	20	0	3	6	10	20
Numbers of Animals:	**Main**	4	4	4	5	5	4	4	4	5	5
	Recovery	2	0	0	2	2	2	0	0	2	2
ISIS 505358 oligonucleotide concentration (µg/g)											
Kidney	**Main - Day 275**	-	294	777	871	764[b]	-	341[b]	640	951	1340[b]
	Recovery - Day 455	-	-	-	-	NQ	-	-	-	-	NQ
Liver	**Day 275**	-	173	302	446	251[b]	-	215[b]	403	435	814[b]
	Recovery - Day 455	-	-	-	-	NQ	-	-	-	-	NQ

Key:
F: female. HPLC-MS/MS: High Performance Liquid Chromatography with Mass spectrometry/mass spectrometry detector. M: male. NQ: not quantifiable
a = The vehicle control and test article were given via subcutaneous injections once per day on Days 1, 5, 10 and 14 and then once weekly thereafter through Day 273. The loading doses during the first two weeks were expressed as mg/kg/dose, while the maintenance doses through Day 273 are expressed as mg/kg/week.
b = n=3

6. PHARMACOKINETICS: PLASMA PROTEIN BINDING

Table 23 Pharmacokinetics: Plasma Protein Binding

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)

Report No.: 2019N419183

Study No.: 505358-IS03

Location in CTD: m4.2.2.3

Analyte Bepirovirsen

Type of Study In Vitro Plasma Protein Binding Study

Method Ultrafiltration / Nuclease-Dependent Hybridization ELISA Assay (number of replicates per species per concentration = 3)

Species	**Mouse**	**Monkey**	**Human**
Bepirovirsen Plasma Concentration (µg/mL)	**% Bound (Mean ± SD)**		
5	96.35 ± 0.09	99.42 ± 0.09	99.01 ± 0.30
150	91.58 ± 0.32	98.28 ± 0.13	94.94 ± 0.22

Key:
ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay. SD = Standard Deviation.

7. PHARMACOKINETICS: STUDY IN PREGNANT OR NURSING ANIMALS

Table 24 Pharmacokinetics: Study in Pregnant or Nursing Animals - Placental Transfer

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Report No.: 2017N337889 **Study No.:** 505358-AS07
Location in CTD: m4.2.3.5.1
Species: Mouse (CD-1)
Gestation Day/Number of Animals: Day 71/male liver, GD 18/fetal and maternal liver, placenta (6M/6F)
Vehicle/Formulation: 0.9%w/v saline
Method of Administration: SC
Dose (mg/kg): 0, 3, 15, 25
Analyte: Bepirovirsen
Assay: HPLC

Dose (mg/kg/every other day)	**0**	**3**	**15**	**25**
Toxicokinetics[a]:				
Male Liver Concentration (µg/g)[b]	0	65.5	407	607
Female Liver Concentration (µg/g)	0	39.7	217	328
Placentae Concentration (µg/g)[c]	NA	0	4.23	17.6
Fetal Liver Concentration (µg/g)[c]	NA	0	0	0

Key:
GD = Gestational Day. HPLC = High Performance Liquid Chromatography. NA = Not Applicable. SC = Subcutaneous
a = TK tissue samples were collected at necropsy on Day 71 for F0 males and GD 18 for F0 females/litters. Final dose administration occurred on Day 69 for F0 males and either GD14 or GD15 for F0 females.
b = Bepirovirsen (GSK3228836) concentrations in maternal and paternal liver tissue increased in a dose dependent manner. The higher tissue concentrations in the males were attributed to a longer duration of dosing.
c = Placentae, fetal liver samples from up to 10 live fetuses per dam were harvested on GD18 then pooled for toxicokinetic analysis; control placentae were collected,but not analyzed. Bepirovirsen was detected in the pooled placental tissue from litters treated with doses of 15 and 25 mg/kg. At the high dose level, this is less than 5.4% the concentration seen in the maternal liver. Bepirovirsen was not detected in fetal liver tissue at any dose level. Overall, these results demonstrate that ISIS 505358 is not readily transported to the embryo or fetus during organogenesis

Table 25 Pharmacokinetics: Study in Pregnant or Nursing Animals - Placental Transfer

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)

Location in CTD: m4.2.3.5.2
Report No.: 2017N337736 **Study No.:** 505358-AS08

Placental Transfer:				
Species:	Rabbit (NZW)			
Gestation Day/Number of Animals:	13 days[a] (3F)			
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline			
Method of Administration:	SC			
Dose (mg/kg):	0, 6, 12.6, 25.2[a]			
Analyte:	Bepirovirsen			
Assay:	HPLC-UV			
Test Article(s) Dose (mg/kg/dose)[b]	**0**	**6**	**12.6**	**25.2**
Tissue concentrations of GSK3228836 (µg/g)				
F0 Females				
Liver (GD20/GD28[c])	NA	194/82.5	452/160	796/392
F1 Fetuses				
Placenta (GD20/GD28)	NA	BLQ/0	20.6/0	51.5/11.2
Liver (GD20/GD28)	NA	0/0	0/0	0/0

Key:
BLQ = Below Limit of Quantification. GD = Gestational Day. HPLC-UV = High Performance Liquid Chromatography with UV detector. NA = Not applicable. NZW = New Zealand White. SC = Subcutaneous.
a = Animals dosed on GD 6, GD 8, GD 10, GD 12, GD 14, GD 16 and GD 18.
b = Animals dosed every other day [7 total occasions with a dose of 21.0°mg/kg/week (6°mg/kg/dose), 44.1°mg/kg/week (12.6°mg/kg/dose) and 88.2°mg/kg/week (25.2°mg/kg/dose)].
c = Sampling occasions GD20 and GD28.

Table 26 Pharmacokinetics: Study in Pregnant or Nursing Animals – Milk Transfer

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)

Location in CTD: m4.2.3.5.3
Report No.: 2023N530614 **Study No.:** 9002027

Species:	Mouse (CD-1)
Gestation Day/Number of Animals:	GD 6 up to LD 21 (6F) (LD10 and LD21)
Vehicle/Formulation:	0.9% w/v saline
Method of Administration:	SC
Dose (mg/kg):	0, 3, 15, 25
Analyte:	Bepirovirsen
Assay:	LC-MS/MS

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**	**3**	**15**	**25**
F_0 Females:				
GSK3228836 concentrations				
Liver (ng/g)				
LD 10	NA	77820	456167	830000
LD 21	BLQ<50.0	255833	476500	898833
Milk (ng/mL)				
LD 10	N/A	BLQ <10.0	11.57	25.98
F1 Litters: Preweaning				
GSK3228836 concentrations (sex-combined)				
Liver (ng/g)				
PND 10	NA	BLQ <50.0	41.91	178.10
PND 21	BLQ <50.0	BLQ <50.0	48.11	139.11

Key:
BLQ = Below Limit of Quantification. GD = Gestational Day. LC-MS/MS = Liquid Chromatography with Mass spectrometry/mass spectrometry detector. LD = Lactation Day. NA = Not Applicable. PND = Post Natal Day. SC = Subcutaneous.

8. PHARMACOKINETICS: OTHER DISTRIBUTION STUDIES

Table 27 Pharmacokinetics: Inhibition and substrate of MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2

Pharmacokinetics: Inhibition and substrate of MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 by GSK3228836	**Test Article:**	Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
	Location in CTD:	m4.2.2.3
	Report No.:	2022N522434
	Study No.:	GSK-62

Type of Study:	A non-GLP in vitro study to determine whether GSK3228836 is an inhibitor of and/or substrate of MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 transporters using human embryonic kidney mammalian (HEK293) cells expressing MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2. The study design also included cell viability and media concentration assessment.
Method:	For inhibition assessment, cells were pre-incubated for 30 minutes in the respective assay buffer in the presence of GSK3228836 (0.046-100 µM for MATE1, MATE2-K, OAT3, OATP1B1, OATP1B3 and OCT2; 0.023-50.0 µM for OAT1 and OCT1). Then the probe substrate was added in a fresh dosing solution of GSK3228836 and following the incubation time, the reaction was stopped by washing the cells with ice-cold buffer. The cells were lysed with 0.1 M NaOH solution and the accumulation of the probe substrate in the cells was determined by liquid scintillation counting. For substrate assessment cells were incubated for 2 and 20 minutes in the respective assay buffer with GSK3228836 (0.100, 1.00 and 10.0 µM) in the presence and absence of transporter specific inhibitor. Following the incubation time, the reaction was stopped by washing the cells with ice-cold buffer. The cells were lysed with methanol:buffer mixture (2:1) and the accumulation of GSK3228836 in the cells was determined by mass-spectrometry. Metformin (10 µM) for MATE1, MATE2-K and OCT2, Sumatriptan (10 µM) for OCT1, Tenofovir (5 µM) for OAT1, E3S (1 µM) for OAT3, $E_2$17βG (1 µM) for OATP1B1 and CCK-8 (1 µM) for OATP1B3 were used as positive control substrates.
Analysis:	Radiodetection, LC-MS/MS (Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry detector)

Pharmacokinetics: Inhibition and substrate of MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 (Continued)

Inhibition assessment of SLC transporters by GSK3228836		
Transporter	**Maximum % inhibition**	**IC_{50} (μM)**
MATE1	NIO	NA
MATE2-K	NIO	NA
OAT1	NIO	NA
OAT3	NIO	NA
OATP1B1	NIO	NA
OATP1B3	NIO	NA
OCT1	NIO	NA
OCT2	NIO	NA

MATE = Multidrug and Toxin Extrusion Transporter = NA = not applicable; NIO = no inhibition observed. OAT = Organic Anion Transporter. OCT = Organic Cation Transporter.

Substrate assessment of SLC transporters by GSK3228836		
Transporter	**Maximum transporter-specific fold accumulation**	**Substrate**
MATE1	NA	ND
MATE2-K	NA	ND
OAT1	NA	ND
OAT3	NA	ND
OATP1B1	NA	ND
OATP1B3	NA	ND
OCT1	NA	ND
OCT2	NA	ND

MATE = Multidrug and Toxin Extrusion Transporter = NA = not applicable; NIO = no inhibition observed. OAT = Organic Anion Transporter. OCT = Organic Cation Transporter.

Pharmacokinetics: Inhibition and substrate of MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 (Continued)

Pharmacokinetics: Inhibition and substrate of BCRP, MRP2 and P-gp by GSK3228836		**Test Article:**	Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
		Location in CTD:	m4.2.2.3
		Report No.:	2022N522434
		Study No.:	GSK-62
Type of Study:	A non-GLP in vitro study to determine whether GSK3228836 is an inhibitor of BCRP, MRP2 and P-gp transporters or substrate of MRP2 transporter using inside-out membrane vesicles prepared from cells overexpressing human ABC (efflux) transporters. A non-GLP in vitro study to determine whether GSK3228836 is a substrate of BCRP and P-gp transporters using BCRP transfected MDCKII or P-gp transfected Abcb1KO-MDCKII cell monolayers. The study design also included recovery and media concentration assessment.		
Method:	For inhibition assessment, vesicles were incubated in the respective assay buffer containing the probe substrate in the presence of GSK3228836 (0.046-100 µM). The reaction was initiated with the addition of ATP or AMP to the solution and following the incubation time the reaction was stopped by the addition of 200 µL of ice-cold washing buffer and immediate filtration via glass fiber filters mounted to a 96-well plate (filter plate). The filters were washed, dried and the amount of substrate inside the filtered vesicles was determined by liquid scintillation counting. For substrate assessment, vesicles were incubated for 10 minutes in the respective assay buffer containing GSK3228836 (1.00 and 10.0 µM nominal concentration) in the presence of ATP or AMP, with or without the reference inhibitor of the respective transporter. The reaction was initiated with the addition of ATP or AMP to the solution and following the incubation time the reaction was stopped by the addition of 200 µL of ice-cold washing buffer and immediate filtration via glass fiber filters mounted to a 96-well plate (filter plate). The filters were washed, dried and the amount of GSK3228836 inside the filtered vesicles was determined by LC-MS/MS. E3S (1 µM) for BCRP, $E_2$17βG (100 µM) for MRP2 and NMQ (1 µM) for P-gp were used as positive control substrates. Bidirectional transport of GSK3228836 was determined through control, MDCKII-BCRP and Abcb1KO-MDCKII-MDR1 cell monolayers. Analysis of GSK3228836 was carried out at two concentrations (10.0 and 100 µM) up to 120 minutes. GSK3228836 was added to the appropriate apical or basolateral chamber. Samples were taken from the helper plate before the incubation and from the donor chambers after the incubation to determine the initial concentration (C_0) and recovery (R) of the test compound and the controls. After incubation the receiver chambers were sampled to determine the amount of translocated GSK3228836 and controls. Samples were analyzed using LC-MS/MS. Prazosin (1 µM) and digoxin (1 µM) were used as positive control substrates.		

Pharmacokinetics: Inhibition and substrate of MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 (Continued)

Analysis:	Radiodetection, LC-MS/MS (Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry detector)	
Inhibition assessment of ABC transporters by GSK3228836		
Transporter	**Maximum % inhibition**	**IC50 (µM)**
BCRP	NIO	NA
MRP2	85	8.49*
P-gp	NIO	NA
Substrate assessment of ABC transporters by GSK3228836		
Transporter	**Maximum Fold accumulation**	**Substrate**
MRP2	0.96	NO
Bidirectional permeability assessment of GSK3228836		
Transporter	**Maximum ER**	**Substrate**
BCRP	NA	NA
P-gp	NA	NA

Key:
BCRP = Breast Cancer Resistance Protein. IC50 = Half-Maximal Inhibitory Concentration. MDCKII = Madin-Darby Canine Kidney Cells MRP2 = Multidrug Resistance Associated Protein 2. NA = not applicable. NIO: no inhibition observed. P-gp= P-Glycoprotein.* = *bottom constrained to 0.

9. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VITRO

Table 28 Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro S9 Liver Fractions

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A) **Report No.:** 2024N562723 **Study No.:** 24DMS001
Location in CTD: m4.2.2.4

Species (Strain): Mouse, Rabbit, Cynomolgus Monkey and Human
Study System: Liver S9 fractions
Procedure: Bepirovirsen sodium salt was incubated for up to 24 h in mouse, rabbit, cynomolgus monkey and human liver S9 fractions at 20 µM, with appropriate controls.
Analysis: UHPLC-MS for Bepirovirsen and drug-related material

Notable Metabolites in Mouse, Rabbit, Cynomolgus Monkey and Human Liver S9 Following Incubation of GSK3228836A for up to 24 h

Component	Proposed structure	Standard solution	Bepirovirsen (20 µM) in liver S9 fractions at 24 h			
			Mouse S9	Rabbit S9	Monkey S9	Human S9
P	5’ G–C–A–G–A–G–G–T–G–A–A–G–C–G–A–A–G–T–G–C 3’ (Bepirovirsen)	✓	✓	✓	✓	✓

Key:
P = peak detected by mass spectrometry
G = Deoxyguanosine.
A = Deoxyadenosine.
T = Thymidine.
C = Deoxy-5-methylcytidine.
G = Methoxyethyl guanosine.
A = Methoxyethyl adenosine.
T = Methoxyethyl thymidine.
C = Methoxyethyl 5-methylcytidine.
– = phosphorothioate linkage.
h = hour. UHPLC-MS = Ultra High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detector.

Table 29 Pharmacokinetics: Metabolism In Silico

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A) **Report No.:** 2023N526136 **Study No.:** NA
Location in CTD: m4.2.2.4

Species (Strain): NA
Study System: In Silico Risk Assessment DDI
Procedure: Bepirovirsen SC dose of 300 mg with a corresponding estimated Cmax of 1.14°µM
Analysis: Basic and mechanistic static model

Summary of Perpetrator Drug Interactions Data

Enzyme /Transporter	**GSK3228836 Direct Inhibition (IC_{50} µM) & Time dependent Inhibition**	**GSK3228836 Induction $EC_{50,u}$ and E_{max}**	***Clinical Risk Flagged by Regulatory Guidance [**FDA, EMA, **ICH M12 or** PMDA**]**
CYP1A2	No inhibition observed	No induction observed	No
CYP2B6	No inhibition observed	No induction observed	No
CYP2C8	>100 µM No TDI	ND	No
CYP2C9	No inhibition observed	ND	No
CYP2C19	No inhibition observed	ND	No
CYP2D6	No inhibition observed	ND	No
CYP3A4	No inhibition observed	No induction observed (Donors 1 & 3) $EC_{50,u}$ = 13.6 µM E_{max} = 2.28-fold (Donor 2)	No
UGT	No inhibition observed	ND	No
P-gp	No inhibition observed	ND	No

Summary of Perpetrator Drug Interactions Data (Continued)

Enzyme /Transporter	GSK3228836 Direct Inhibition (IC_{50} μM) & Time dependent Inhibition	GSK3228836 Induction $EC_{50,u}$ and E_{max}	*Clinical Risk Flagged by Regulatory Guidance [FDA, EMA, ICH M12 or PMDA]
BCRP	No inhibition observed	ND	No
MRP2	8.493 μM	ND	No
OATP1B1	No inhibition observed	ND	No
OATP1B3	No inhibition observed	ND	No
OAT1	No inhibition observed	ND	No
OAT3	No inhibition observed	ND	No
OCT1	No inhibition observed	ND	No
OCT2	No inhibition observed	ND	No
MATE1	No inhibition observed	ND	No
MATE2-K	No inhibition observed	ND	No

Key:
ND = Not determined; CYP = Cytochrome P450; UGT = Uridine diphosphoglucuronosyltransferase; BCRP = Human breast cancer resistance protein; P-gp = P-glycoprotein; MRP2 = multidrug resistance-associated protein 2; OATP = Organic anion transporting polypeptide; OAT = Organic anion transporter; OCT = Organic cation transporter; MATE = Multidrug and toxin extrusion transporter, TDI = Time dependent inhibition (conducted for CYPs only, not UGTs)

*Yes/No indicates clinical drug-drug interaction (DDI) risk according to either in vitro data, basic or mechanistic static models provided by regulatory guidance (FDA, 2020; EMA, 2013; PMDA, 2018; ICH M12, 2024) for GSK3228836 (at a therapeutic dose of 300 mg following subcutaneous (SC) administration weekly for 24 weeks (median) with corresponding estimated Cmax of 1.14 μM) (8.39 ug/mL) (Phase 2 Population PK report, RPS-CLIN-113368)

10. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VIVO

Table 30 Pharmacokinetics: Mouse and Monkey Tissue Metabolism In Vivo

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A) **Location in CTD:** m4.2.3.2

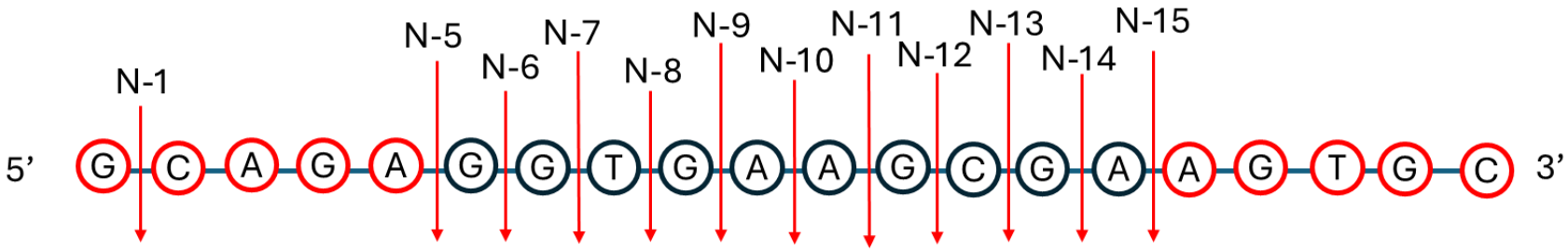
	Report No.: 2019N417087 **Study No.:** 505358-AS01PK (727-054)		**Report No.:** 2019N417078 **Report:** 505358-AS02PK	
Species:	Mouse (CD-1)		Monkey (cynomolgus)	
Vehicle/Formulation:	0.9%w/v saline		0.9%w/v saline	
Method of Administration:	SC		IV/SC	
Dose (mg/kg):	0, 4, 12, 40, 100[c]		0, 4, 8, 12; 40[b], 8[c]	
No Animals:	6M/6F		3M/3F2M/2F[R;] 3M/3F+2M/2F[R;] 7M/7F	
Analyte:	Bepirovirsen		Bepirovirsen	
Assay:	LC-UV		LC-UV	
Sampling Day	93 (48h since last dose)		93 (48h since last dose)	
	Relative Proportions (% of Total Peak Area) in Sample (Mean)[a, b]			
Matrix	**Mouse Liver**	**Mouse Kidney**	**Monkey Liver**	**Monkey Kidney**
Bepirovirsen (N)	62.09	76.66	79.1	89.3
N-1	2.21	3.01	2.61	2.51
N-5	0.77	ND	0.58	ND
N-6	2.41	1.32	1.34	ND
N-7	2.04	1.61	1.26	ND
N-8	3.51	1.51	1.39	0.87
N-9	3.96	2.43	1.81	0.29
N-10	5.72	5.01	3.63	3.33
N-11	5.71	4.31	1.64	1.27
N-12	2.55	1.61	1.44	1.19
N-13	1.80	1.17	1.66	1.07
N-14	1.39	0.42	0.77	0.23
N-15	5.85	0.95	2.80	ND

Key:
a = Relative amounts of metabolites provided as general estimates for information purposes only. Metabolites were provisionally identified by relative migration time.
b = Selected metabolites based on >2% total peak area for reported mean values from at least one tissue type
c = Load: Days 1, 3, 5; Maintenance: q1w x 13 weeks beginning on Day 7.
F = Female. h = hour. IV = Intravenous. LC-UV = Liquid Chromatography with UV detector. M = Male. ND = Not Determined. SC = Subcutaneous;

11. PHARMACOKINETICS: POSSIBLE METABOLIC PATHWAYS

Table 31 Pharmacokinetics: Possible Metabolic Pathways

Illustration of potential in vivo metabolism of bepirovirsen in liver and kidney tissue from mouse and cynomolgus monkey repeat dose toxicity studies [GSK Reports 2019N417087 **and** 2019N417078**, m4.2.3.2]**



Metabolite		N-1	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10	N-11	N-12	N-13	N-14	N-15
Mouse													
	Liver	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Kidney	✓	ND	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Monkey													
	Liver	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Kidney	✓	ND	ND	ND	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	ND

Key:
ND = Not determined

12. PHARMACOKINETICS: HUMAN METABOLISM

Table 32 Pharmacokinetics: Human Tissue Metabolism

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)
Report No.: 2025N567431 (Study No. 8555573)
Location in CTD: m4.2.2.4

Species:	Human
Vehicle/Formulation:	-
Method of Administration:	SC
Dose (mg/kg):	300
No Subjects:	25
Analyte:	Bepirovirsen
Assay:	UPLC-UV-HRMS
Sampling Day	Week 24 (last dose)

Summary of Bepirovirsen and its metabolites in Human Plasma

Matrix					**Human Plasma**			
No.	**Identification**	**RT**	**Experimental m/z**	**Charge Sate**	**Mono Mass Exp**	**Average Mass Exp.**	**Mono Mass Theo**	**Delta (ppm)**
M1	G1-G4	6.33	777.166	-2	1556.3464	1556.9300	1556.3475	-0.68
			1555.342	-1	1556.3489	1557.0400	1556.3475	0.86
			767.144	-3	2304.4546	2305.6500	2304.4487	2.54
M2	G1-G6	7.13	1151.720	-2	2304.4514	2305.8300	2304.4487	1.17
			2304.449	-1	2304.4414	2305.3800	2649.4785	-3.17
			882.488	-3	2649.4824	2650.9900	2649.4785	1.47
M3	G1-G7	7.14	1324.234	-2	2649.4807	2650.9700	2649.4785	0.83
			906.468	-3	2720.4199	2721.5400	2720.4154	1.67
M4	G14-C20	7.40	1359.702	-2	2720.4194	2721.9700	2720.4154	1.49
M5	G1-T8	7.41	1484.246	-2	2969.5039	2971.4200	2969.5017	0.74
			828.130	-4	3314.5420	3316.5200	3314.5312	3.24
M6	G1-G9	7.53	1104.840	-3	3314.5386	3316.5400	3314.5312	2.21
			1657.265	-2	3314.5403	3316.5400	3314.5312	2.73
			845.368	-4	3384.4905	3386.0600	3384.4842	1.84
M7	G12-C20	7.69	1127.489	-3	3384.4885	3386.7300	3384.4842	1.27
			1692.238	-2	3384.4902	3386.7200	3384.4842	1.77
			1213.849	-3	3643.5703	3645.3900	3643.5660	1.18

Pharmacokinetics: Human Tissue Metabolism (Continued)

No.	Identification	RT	Experimental m/z	Charge Sate	Mono Mass Exp	Average Mass Exp.	Mono Mass Theo	Delta (ppm)
M8	G1-A10	7.70	1822.275	-2	3643.5613	3646.1700	3643.5659	-1.27
Bepirovirsen	G1-C20	9.11	2446.685	-3	7339.0122	7343.8700	7339.0744	-8.45

M1: 5’ G–C–A–G 3’, G1-G4.
M2: 5’ G–C–A–G–A–G 3’, G1-G6.
M3: 5’ G–C–A–G–A–G–G 3’, G1-G7.
M4: 5’ G–A–A–G–T–G–C 3’, G14-C20.
M5: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T 3’, G1-T8.
M6: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T–G 3’, G1-G9.
M7: 5’ G–C–G–A–A–G–T–G–C 3’, G12-C20.
M8: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T–G–A 3’, G1-A10.
Bepirovirsen: 5’ G–C–A–G–A–G–G–T–G–A–A–G–C–G–A–A–G–T–G–C 3’, G1-C20.
Note: Delta (ppm) = 10^6 x (Mono Mass Exp. – Mon Mass Theo)/Mono Mass Theo. The values were from Biopharma Finder 4.0.

13. PHARMACOKINETICS: INDUCTION/INHIBITION OF DRUG METABOLISING ENZYMES

Table 33 Pharmacokinetics: In Vitro Induction of CYP450 1A2, 2B6 and 3A4

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A) **Report No.:** 2022N522535 **Study No.:** 22DMM045
Location in CTD: m4.2.2.4

Study System: Cultured Human Hepatocytes

Tested Concentration Range: GSK3228836 – 0.01 - 200 µM; Rifampicin – 0.01 - 30 µM; Phenobarbital - 1500 µM, Omeprazole - 100 and 150 µM; and Flumazenil - 50 µM

Method: The assay was performed in cryopreserved human hepatocytes from 3 donors. Cryopreserved hepatocytes were incubated at approximately 37°C for 48 hours with GSK3228836 and positive controls including prototypical inducers (rifampicin, omeprazole, phenobarbital) and a negative control inducer (flumazenil), in triplicate. Assessment of the effect on mRNA was evaluated by measuring mRNA levels of each CYP gene (CYP1A2, 2B6 and 3A4) via *TaqMan* analysis.

Analysis: *TaqMan* Real Time PCR

Effect of GSK3228836 and Prototypical Inducers on mRNA Levels of Cytochrome P450 Enzymes (Mean ratio of treated over control)									
	CYP1A2[b]			**CYP2B6[b]**			**CYP3A4[b]**		
Treatment	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3
DMSO Control	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.01 µM GSK3228836	0.930	ND	ND	1.14	ND	ND	0.706	ND	ND
0.03 µM GSK3228836	0.918	ND	ND	1.06	ND	ND	0.693	ND	ND
0.1 µM GSK3228836	0.930	ND	ND	1.06	ND	ND	0.547	ND	ND
0.3 µM GSK3228836	1.05	1.09	0.754	1.21	1.12	0.567	0.554	1.14	0.775
1.0 µM GSK3228836	0.985	0.914	0.656	1.17	0.881	0.452	0.726	1.13	0.619
3.0 µM GSK3228836	0.927	1.08	0.578	1.03	1.04	0.362	0.742	1.34	0.472
10 µM GSK3228836	1.01	1.24	0.606	1.19	1.17	0.401	0.676	1.44	0.580
30 µM GSK3228836	1.18	1.19	0.675	1.48	1.18	0.560	0.929	1.87	1.04
50 µM GSK3228836	1.01	1.23	0.802	1.41	1.21	0.618	1.07	2.04	1.32
100 µM GSK3228836	1.03	1.51	0.768	1.54	1.51	0.579	1.10	2.39	1.18
200 µM GSK3228836	ND	ND	0.828	ND	ND	0.668	ND	ND	1.46
Prototypical Inducer [a]	3.38	10.1	7.58	8.28	5.20	9.96	21.2	44.0	65.2
Negative Control[c]	1.05	1.50	0.948	1.38	1.51	1.01	1.58	1.82	1.23
GSK3228836 EC50,u[d] (µM)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13.6	NA
GSK3228836 Emax	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2.28	NA
Rifampicin EC50 (µM)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.492	0.916	0.901

Pharmacokinetics: In Vitro Induction of CYP450 1A2, 2B6 and 3A4 (Continued)

Test Article: Bepirovirsen sodium (GSK3228836A) **Report No.:** 2022N522535 **Study No.:** 22DMM045
Location in CTD: m4.2.2.4

Study System: Cultured Human Hepatocytes

Tested Concentration Range: GSK3228836 – 0.01 - 200 µM; Rifampicin – 0.01 - 30 µM; Phenobarbital - 1500 µM, Omeprazole - 100 and 150 µM; and Flumazenil - 50 µM

Method: The assay was performed in cryopreserved human hepatocytes from 3 donors. Cryopreserved hepatocytes were incubated at approximately 37°C for 48 hours with GSK3228836 and positive controls including prototypical inducers (rifampicin, omeprazole, phenobarbital) and a negative control inducer (flumazenil), in triplicate. Assessment of the effect on mRNA was evaluated by measuring mRNA levels of each CYP gene (CYP1A2, 2B6 and 3A4) via *TaqMan* analysis.

Analysis: *TaqMan* Real Time PCR

Effect of GSK3228836 and Prototypical Inducers on mRNA Levels of Cytochrome P450 Enzymes
(Mean ratio of treated over control)

	CYP1A2[b]			**CYP2B6[b]**			**CYP3A4[b]**		
Treatment	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3
Rifampicin Emax	NA	NA	NA	NA	NA	NA	21.0	40.3	61.5

Key:
CYP = Cytochrome P450. EC50 = Half Maximal Effective Concentration. Emax = Maximal Effective Concentration. NA = Not applicable. ND = Not determined. RT-PCR = Real Time Polymerase Chain Reaction. u = unbound.

a. Prototypical CYP Inducers: 100 µM (donor 1) and 150 µM (donors 2 and 3) Omeprazole (CYP1A2), 1500 µM Phenobarbital (CYP2B6), 30 µM Rifampicin (CYP3A4)
b. Increase in mRNA level of ≥ 2-fold mean ratio of treated over control is considered as a notable induction response for all prototypical CYP inducers and GSK3228836.
c. Negative Control: 50 µM Flumazenil (CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4). Negative control should show ≤ 2-fold mRNA change (mean ratio of treated over control).
d. EC50,u value for GSK3228836 was calculated using measured media concentration values, accounting for any non-specific binding to the plasticware.

Table 34 Pharmacokinetics: In Vitro Inhibitor of CYP450 and glucuronosyltransferase

Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions				**Test article:**	Bepirovirsen sodium (GSK3228836A)	
				Location in CTD:	m4.2.2.4	
				Study no.:	XT225122	
				Report No:	2022N522533	
Type of study:	In vitro evaluation of GSK3228836A as an inhibitor of human cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzymes in suspended cryopreserved human hepatocytes					
Method:	Enzyme activities for the IC50 determinations were measured by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Incubations were performed using suspended cryopreserved human hepatocytes at 1 million cells/mL and a probe substrate added at a concentration equivalent to its approximate Km or S50 value.					
Tabulated results:						
Enzyme	**Probe Substrate**	**Direct inhibition**		**Time-dependent inhibition [a]**		**Inhibition potential**
		Zero-min preincubation		**30-min preincubation**		
		IC50 (µM)	**Maximum inhibition (%)**	**IC50 (µM) ± SE**	**Maximum inhibition (%)**	
CYP1A2	Phenacetin	> 100	29.4	> 100	20.3	None
CYP2B6	Bupropion	> 100	8.90	> 100	NA	None
CYP2C8	Amodiaquine	> 100	42.6	94 ± 11	51.7	Direct
CYP2C9	Diclofenac	> 100	22.8	> 100	17.2	None

Pharmacokinetics: Metabolism In Vitro Inhibitor of CYP450 and glucuronosyltransferase (Continued)

Tabulated results:

Enzyme	Probe Substrate	Direct inhibition		Time-dependent inhibition [a]		Inhibition potential
		Zero-min preincubation		30-min preincubation		
		IC50 (µM)	Maximum inhibition (%)	IC50 (µM) ± SE	Maximum inhibition (%)	
CYP2C19	*S*-Mephenytoin	> 100	8.0	> 100	12.0	None
CYP2D6	Dextromethorphan	> 100	21.5	> 100	8.0	None
CYP3A4/5	Midazolam	> 100	28.5	> 100	28.3	None
CYP3A4/5	Testosterone	> 100	7.9	> 100	10.0	None
UGT [b]	4-Methylumbelliferone	> 100	20.1	ND		None

Additional information:

CYP	Cytochrome P450
IC50	Half Maximal Inhibitory Concentration
Km	Michaelis-Menten Constant
NA	Not applicable. No value was obtained as the rates at all concentrations of GSK3228836A were higher than the control rates.
ND	Not determined. UGT enzymes were not evaluated for time-dependent inhibition.
SE	Standard Error
S50	Substrate concentration for allosteric kinetics which supports half the maximum rate of an enzyme-catalyzed reaction
UGT	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase
a	Potential time-dependent inhibition is indicated when the IC_{50} value decreases by a factor of ≥ 1.5. If the inhibition observed is insufficient to calculate IC_{50} values for any set of samples, percent activities remaining at each concentration may be compared. In this case, a signal for time-dependent inhibition is potentially indicated when mean percent activity remaining decreases by ≥ 20% of that in the respective comparator samples at any concentration.
b	UGT inhibition was measured using a marker substrate that is metabolized by multiple UGT isoforms.

14. PHARMACOKINETICS: EXCRETION

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen.

15. PHARMACOKINETICS: EXCRETION INTO BILE

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen.

16. PHARMACOKINETICS: DRUG-DRUG INTERACTIONS

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen.

17. PHARMACOKINETICS: OTHER

No studies appropriate to this category have been performed with bepirovirsen

18. REFERENCES

Regulatory Guidelines (Not provided)

European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Investigation of Drug Interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2, London, UK; 2013.

Food and Drug Administration (FDA). In Vitro Drug Interaction Studies - Cytochrome P450 Enzyme and Transporter-Mediated Drug Interactions, Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Silver Spring, MD; 2020.

Food and Drug Administration (FDA). Clinical Pharmacology Considerations for the Development of Oligonucleotide Therapeutics Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Silver Spring, MD; 2022 (Draft).

ICH M12 on drug interaction studies. EMA, 2024.

PMDA (2018) Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information.