目次

2.6.1 緒言 3

略号一覧表

略号又は略称	名称及び内容
AR	アンドロゲン受容体（androgen receptor）

2.6.1 緒言

アパルタミド（図 2.6.1-1：JNJ-56021927，ARN-509）は分子量 477.43 の経口投与可能な選択的アンドロゲン受容体（AR）阻害薬であり，AR のリガンド結合部位に直接結合する。アパルタミドは AR の核内移行を阻害し，AR の DNA への結合を阻害して AR を介する転写を抑制する。非臨床薬理試験において，アパルタミドは AR アゴニスト活性を示さず，前立腺癌モデルにおいて癌細胞の増殖を抑制し，アポトーシスを促進することにより強い抗腫瘍効果を示した。

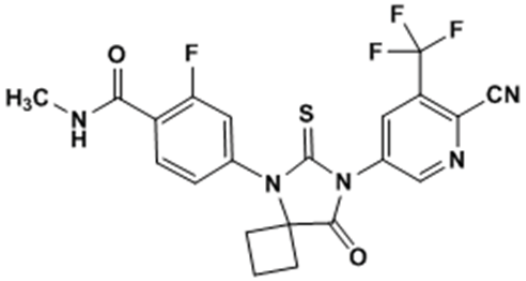


図 2.6.1-1 アパルタミド（JNJ-56021927，ARN-509）の化学構造式

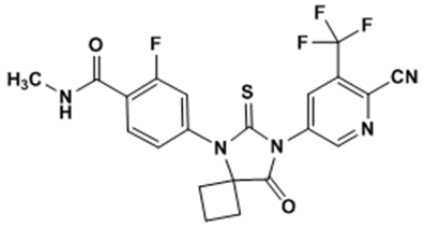
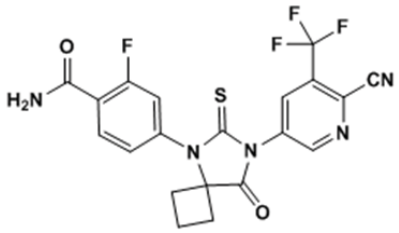
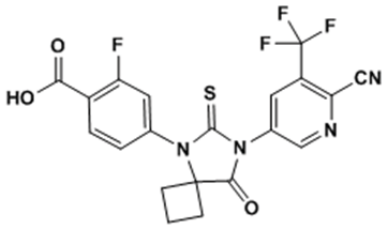
本邦での本剤の医薬品製造販売承認申請における効能・効果（案）及び用法・用量（案）は，以下のとおりとした。

【効能・効果（案）】
去勢抵抗性前立腺癌
【用法・用量（案）】
通常，成人にはアパルタミドとして 1 日 1 回 240 mg を経口投与する。

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.3 副次的薬理試験 18
2.6.2.4 安全性薬理試験 20
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 22
2.6.2.6 考察及び結論 23
2.6.2.7 図表 27
2.6.2.8 参考文献 28
2.6.3 薬理試験概要表 1

略号一覧表

略号又は略称	化学名又は一般名	構造式	由来
アパルタミド（JNJ-56021927, ARN-509）	4-{7-[6-Cyano-5-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]-8-oxo-6-thioxo-5,7-diazaspiro[3.4]octan-5-yl}-2-fluoro-*N*-methylbenzamide		主薬
JNJ-56142060（ARN000308, ARN-308）	*N*-脱メチル体（M3）		代謝物
JNJ-56142021（ARN000066, ARN-66）	アミド加水分解体（カルボン酸）（M4）		代謝物

略号又は略称	名称及び内容
APA	活動電位振幅（action potential amplitude）
APD	活動電位持続時間（action potential duration）
$APD_{60\ or\ 90}$	60 又は 90%再分極時の活動電位持続時間（action potential duration at 60% or 90% repolarization）
AR	アンドロゲン受容体［androgen receptor(s)］
ARE	アンドロゲン応答配列（androgen response element）
AR-EYFP	強化黄色蛍光タンパク質で標識した AR（androgen receptor tagged with enhanced yellow fluorescent protein）
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve）
$AUC_{0\text{-}24h}$	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24 hours）
ChIP	クロマチン免疫沈降（chromatin immunoprecipitation）
CHO	チャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary）
C_{max}	最高血漿中濃度（maximum plasma concentration）
CMC	カルボキシメチルセルロース（carboxymethyl cellulose）
CNS	中枢神経系（central nervous system）
CSS	チャコール処理血清（charcoal-stripped serum）
CRPC	去勢抵抗性前立腺癌（castration-resistant prostate cancer）
DMSO	ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide）
ECG	心電図（electrocardiography）
ERα	エストロゲン受容体 α（estrogen receptor-alpha）
FDA	米国食品医薬品局（Food and Drug Administration）

略号又は略称	名称及び内容
^{18}F-FDHT	16β-[^{18}F]-fluoro-5α-ジヒドロテストステロン （16β-[^{18}F]-fluoro-5α-dihydrotestosterone）
FOB	機能観察総合評価（functional observational battery）
GABA	γ-アミノ酪酸（γ-aminobutyric acid）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
GR	グルココルチコイド受容体（glucocorticoid receptor）
hERG	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子 （human ether-à-go-go-related gene）
HR	ホルモン受容体［hormone receptor(s)］
IC_{50}	50%阻害濃度（half-maximal inhibitory concentration）
LNCaP	リンパ節由来前立腺癌（lymph node-derived carcinoma of the prostate）
LNCaP/AR	AR を遺伝子導入した LNCaP 細胞（LNCaP cells transfected with androgen receptor）
LNCaP/AR(cs)	AR（コドンスイッチ置換）を遺伝子導入した LNCaP 細胞 ［LNCaP cells transfected with androgen receptor (codon switch)］
LNCaP/AR-Luc	ルシフェラーゼ遺伝子を導入した LNCaP/AR 細胞 （LNCaP/AR cells with integrated androgen receptor-driven luciferase reporter construct）
OECD	経済協力開発機構 （Organisation for Economic Co-operation and Development）
PEG	ポリエチレングリコール（polyethylene glycol）
PFT	プルキンエ線維用 Tyrodes（Purkinje fiber Tyrodes）
PR	プロゲステロン受容体（progesterone receptor）
PSA	前立腺特異抗原（prostate-specific antigen）
PTZ	ペンチレンテトラゾール（pentylenetetrazole）
PVP	ポリビニルピロリドン（polyvinylpyrrolidone）
QTc	補正 QT（corrected QT）
QTcR	心拍数で補正した QT（QT corrected for heart rate）
QTcB	Bazett の式で補正した QT（QT corrected according to Bazett’s formula）
QTcF	Fridericia の式で補正した QT（QT corrected according to Fridericia's formula）
QTcV	Van de Water の式で補正した QT （QT corrected according to Van de Water’s formula）
RMP	静止膜電位（resting membrane potential）
SD	標準偏差（standard deviation）
TK	トキシコキネティクス（toxicokinetics）
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間（time to reach the maximum plasma concentration）
TMPRSS2	膜貫通型セリンプロテアーゼ 2（transmembrane protease serine 2）
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick end labeling
VCaP	脊髄転移部位由来前立腺癌（vertebra-derived carcinoma of the prostate）
VitE-TPGS	水溶性ビタミン E（D-α-トコフェロール-ポリエチレングリコールコハク酸エステル） ［water-soluble vitamin E (D-α-tocopherol polyethylene glycol succinate conjugate)］
V_{max}	最大脱分極速度（maximum rate of depolarization）
VP16	ビリオンタンパク質 16（virion protein 16）

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

アパルタミド（JNJ-56021927，ARN-509）は経口投与可能な選択的アンドロゲン受容体（AR）阻害薬であり，去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）に対する治療薬として開発された薬剤である。

2.6.2.1.1 薬理評価概要

In vitro の効力を裏付ける試験として，AR（コドンスイッチ置換[1]）を遺伝子導入したリンパ節由来前立腺癌［LNCaP/AR(cs)］細胞を用い，AR に対するアパルタミドの結合及び阻害作用を検討した。アパルタミドの AR に対する結合親和性は，16β-[^{18}F]-fluoro-5α-ジヒドロテストステロン（^{18}F-FDHT）をリガンドとした LNCaP/AR(cs)細胞上での競合的結合試験により測定した。また，AR と核内ホルモン受容体（HR）との結合選択性を検討するため，プロゲステロン受容体（PR），エストロゲン受容体 α（ERα）及びグルココルチコイド受容体（GR）等の核内 HR との結合性を蛍光偏光法を用いて評価し，各受容体に対する陽性対照化合物と比較した。さらに，脊髄転移部位由来前立腺癌（VCaP）細胞を用い，アンドロゲン非存在下でアゴニスト活性を評価した。一連の *in vitro* での効力を裏付ける試験において，AR 阻害薬であるビカルタミド及びエンザルタミド（MDV3100）を比較対照薬として：1）AR 核内移行，2）既知の AR 標的遺伝子［前立腺特異抗原（PSA）並びに膜貫通型セリンプロテアーゼ 2（TMPRSS2）］のエンハンサー領域への AR 結合，並びに 3）AR 依存性遺伝子の転写，を検討し，前立腺癌細胞におけるアパルタミドの作用機序を明らかにした。

In vivo での効力を裏付ける試験として，ルシフェラーゼ遺伝子を導入した LNCaP/AR（LNCaP/AR-Luc）細胞の異種移植マウスを用い，*in vivo* での AR 依存性遺伝子転写に対する作用を検討した。また，アパルタミドの抗腫瘍効果は，LNCaP/AR(cs)細胞を異種移植したマウスモデルを用いて 1～100 mg/kg/日の用量で複数の独立した試験を実施し，腫瘍体積の変化を指標に評価した。また，増殖（Ki-67 免疫組織染色法）及びアポトーシス［terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling（TUNEL）法］の変化も検討した。さらに，正常濃度のアンドロゲン存在下でのアンドロゲン依存性生殖器官に対するアパルタミドの薬理作用を，毒性試験の一部として非去勢雄ラット及びイヌにおいて検討した。

非臨床試験の動物種で同定された 4 種類のアパルタミド代謝物［M1，JNJ-56142047（M2），JNJ-56142060（M3）及び JNJ-56142021（M4）］の AR に対する作用を，リガンド誘発 AR 依存性遺伝子転写を指標にした細胞アッセイで評価した。

副次的薬理試験では，種々の受容体，イオンチャネル及びトランスポーターに対するアパルタミドの阻害作用を *in vitro* で検討した。4 種類のアパルタミド代謝物についても，γ-アミノ酪酸（GABA）開口性クロライドチャネルを含む GABA 受容体結合に対する作用を検討した。また，*in vivo* でのアパルタミドの痙攣誘発性をマウスペンチレンテトラゾール（PTZ）誘発痙攣モデルを用いて検討した。

[1] 内因性T877A変異ARを発現するLNCaP細胞に，野生型ARを外因性に発現させる

安全性薬理試験では，*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施し，アパルタミドの中枢神経系（CNS），心血管系及び呼吸系への影響を検討した。アパルタミドの CNS に及ぼす影響を検討するために，機能観察総合評価（FOB）検査を SD（Spraque-Dawley）ラットの 28 日間反復経口投与毒性試験に組み込んで実施した。アパルタミド及びヒト血漿中の主要代謝物 M3 のヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）チャネル介在性カリウム電流，並びに摘出イヌ心室プルキンエ線維の心筋活動電位に対する影響を *in vitro* 試験で検討した。また，電気生理を含む心血管系への影響をテレメトリー装着覚醒イヌの *in vivo* 試験で検討した。アパルタミド及び代謝物 M3 の呼吸系への影響を SD ラットで検討した。

アパルタミド及び代謝物 M3 の副次的及び安全性薬理試験を表 2.6.2-1 にまとめた。特に記載しない限り，主要な安全性薬理試験は米国食品医薬品局（FDA）の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）規則（21 CFR Part 58）及び経済協力開発機構（OECD）加盟国の GLP 原則（2004/10/EC）を遵守して実施した。

In vivo 安全性薬理試験では脂質ベースのエマルジョンを溶媒とした。その溶媒は Acconon MC8-2，Capmul MCM，ポリエチレングリコール（PEG）400 及び水溶性ビタミン E（D-α-トコフェロール-ポリエチレングリコールコハク酸エステル：VitE-TPGS）をそれぞれ 10：45：30：15%（w/w/w/w）の割合で含有する。特に断りのない限り，試験にはアパルタミドのエタノール付加物（JNJ-56021927-ZAH）を用いた。投与用量は，遊離塩基に換算して表示した。

表 2.6.2-1 副次的及び安全性薬理試験一覧

Organ System Evaluated	Route of Administration	Species/ Test System	Test Compound Dose/Concentration	Module 4
Receptors/Ion channels/Transporters[a]	*In vitro*	Binding assays with 55 receptors/ion channels/transporters	Apalutamide: 10 µmol/L	4.2.1.2.1
Receptors[a]	*In vitro*	GABA-gated receptor binding assay - half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) determination	Apalutamide: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 µmol/L	4.2.1.2.2
Receptors[a]	*In vitro*	$GABA_A$-receptor guinea pig ileum bioassay- IC_{50} determination	Apalutamide: 0.3, 1, 3, 10, and 30 µmol/L	4.2.1.2.3
Receptors[a]	*In vitro*	GABA-gated receptor binding assay	Metabolite M1: 10 µmol/L	4.2.1.2.4
Receptors[a]	*In vitro*	GABA-gated receptor binding assay - IC_{50} determination	Metabolite JNJ-56142047 (M2): 1, 3, 10, 30 and 100 µmol/L Metabolite JNJ-56142060 (M3): 1, 3, 10, 30 and 100 µmol/L Metabolite JNJ-56142021 (M4): 1, 3, 10, 30 and 100 µmol/L	4.2.1.2.5
PTZ Infusion Seizure Model[a]	Oral	Male mice	Apalutamide: 10, 30, 100, and 300 mg/kg Enzalutamide (MDV3100): 10, 30, 100, and 300 mg/kg	4.2.1.2.6
Central Nervous System (FOB in 28-day toxicology study)	Oral	Male rats	Apalutamide: 0, 50, 150, and 250 mg/kg/day[b]	4.2.1.3.1
Cardiovascular System	*In vitro*	Chinese hamster ovary (CHO)-K1/hERG cells	Apalutamide: 0, 1, 3, 10 and 30 µmol/L Metabolite JNJ-56142060 (M3): 0, 1, 3, 10 and 30 µmol/L	4.2.1.3.2
Cardiovascular System	*In vitro*	Isolated canine cardiac Purkinje fibers	Apalutamide: 0, 3, 10 and 30 µmol/L Metabolite JNJ-56142060 (M3): 0, 3, 10 and 30 µmol/L	4.2.1.3.3
Cardiovascular System	Oral	Male and female dogs	Apalutamide: 0, 10, 20 and 40 mg/kg	4.2.1.3.4
Respiratory System	Oral	Male rats	Apalutamide: 0, 25, 50, and 100 mg/kg Metabolite JNJ-56142060 (M3): 0, 25, 50, and 100 mg/kg	4.2.1.3.5

[a] Non-GLP study
[b] The highest dose tested in the FOB was 150 mg/kg/day

2.6.2.1.2 主な試験成績

2.6.2.1.2.1 効力を裏付ける試験

アパルタミドは，非ステロイド系の合成低分子 AR 阻害薬である。LNCaP/AR(cs)細胞を用いた ^{18}F-FDHT との競合的結合試験において，アパルタミドは第一世代の AR 阻害薬であるビカルタ

ミドの約 10 倍の結合親和性で AR に直接結合し［平均 50%阻害濃度（IC_{50}） = 16.0 nmol/L］，他の核内 HR（PR，ERα 及び GR）への結合と比較して，AR に選択的に結合した。ビカルタミドと異なり，アパルタミドはアンドロゲン非存在下で細胞増殖に対してアゴニスト活性を示さなかった。一連の *in vitro* 試験で，アパルタミドは LNCaP 細胞において AR の核内移行を抑制し，LNCaP/AR(cs)細胞において AR 依存性遺伝子（PSA 及び TMPRSS2）のエンハンサー領域への AR の結合を阻害した。また，ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを用いた試験において，アパルタミドはルシフェラーゼ発現を抑制した。さらに，コアクチベーターの動員を必要としない強力な転写活性化因子であるビリオンタンパク質 16（VP16）の制御下で AR を発現するように設計された Hep-G2 肝細胞癌細胞株と同様に LNCaP/AR-Luc 細胞においても，アパルタミドは合成アンドロゲン R1881 によるルシフェラーゼ発現を抑制した。

以上の *in vitro* での試験の結果から，アパルタミドは AR のリガンド結合部位に結合し，核内移行，標的 DNA への結合及び AR 依存性遺伝子の転写活性化を阻害することが示された。また，アパルタミドは他の HR に比べて AR に選択的に結合し，アンドロゲン非存在下でアゴニスト活性を示さないことが明らかになった。

In vivo での効力を裏付ける試験をマウスで実施した。アパルタミドの *in vivo* 薬理活性を評価するため，LNCaP/AR-Luc 細胞［外因性 AR 及び AR 依存性プロバシン：ルシフェラーゼ（ARR2-Pb-Luc）レポーターを共発現］を異種移植したマウスモデルにおいて，アパルタミドを経口投与した動物の AR 応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子転写活性が，溶媒投与動物に比べて一貫して低下したことから，*in vivo* におけるアパルタミドの AR 阻害作用が示された。LNCaP/AR(cs)細胞を異種移植した去勢マウスにおいてアパルタミド（10 mg/kg/日）の抗腫瘍効果をビカルタミド（10 mg/kg/日）と比較した。本モデルにおけるビカルタミドの抗腫瘍効果が腫瘍退縮よりも主に増殖抑制に限定されたものであったのに対し，アパルタミド投与群の腫瘍では 10 例中 8 例に 50%以上の腫瘍退縮がみられた。このような強い抗腫瘍効果に一致して，アパルタミド投与群の腫瘍では Ki-67 染色を指標とした増殖（対溶媒投与群）は約 60%低下し，TUNEL を指標としたアポトーシス率（対溶媒投与群）は約 10 倍上昇した。LNCaP/AR(cs)細胞の異種移植マウスモデルを用いた一連の試験において，アパルタミドの効力をエンザルタミドとも比較したところ，少数例（7～8 例）の試験では，両被験薬とも有効であり腫瘍退縮がみられたが，両被験薬間で効力に有意な差は認められなかった。統計学的な有意差を検出するために例数を 19～20 例に増加した試験では，投与 28 日目においてアパルタミド 30 mg/kg/日投与群の 20 例中 13 例で腫瘍体積が 50%以上低下したのに対して，エンザルタミド 30 mg/kg/日投与群では 50%以上低下した動物は 19 例中 3 例であった（$p < 0.05$）。また，別に実施した追加の LNCaP/AR(cs)細胞異種移植マウスモデルを用いた複数用量（1，10，30 及び 100 mg/kg）の試験においてもアパルタミドの効力が確認された。

非去勢の雄ラット及びイヌの毒性試験において，アパルタミドは雄性生殖器に対して薬理作用に由来する抗アンドロゲン作用を示した。すなわち，雄ラットへの 25 mg/kg/日以上の投与で，前立腺，精嚢及び精巣上体の萎縮，精巣の変性，精巣間細胞（ライディッヒ細胞）の過形成がみられ，雄イヌへの 2.5 mg/kg/日以上の投与で，前立腺及び精巣上体の萎縮，精細管の変性／萎縮（精子低形成を含む）及び精巣間細胞の肥大がみられた。

代謝物 M1，M2 及び M4 の AR に対する作用はアパルタミドの約 1/30 以下であり，薬理活性を持たないことが示唆された。代謝物 M3 は，代謝物の中で最も強い AR 阻害作用を示したが，リガンド誘発 AR 依存性遺伝子転写における作用はアパルタミドの約 1/3 であった。

2.6.2.1.2.2 副次的薬理試験

放射性標識リガンドを用いた受容体結合試験において，アパルタミドは GABA 開口性クロライドチャネルに対してのみ有意な阻害作用を示した。GABA 開口性クロライドチャネルへの放射性標識リガンドの結合に対するアパルタミド及び代謝物 M3 の IC_{50} は，それぞれ 3.0 及び 3.2 μmol/L であった。代謝物 M1，M2 及び M4 の IC_{50} は 10 μmol/L 以上であり，このチャネルに対する作用はないと考えられた。組織を用いた機能性試験において， $GABA_A$ 受容体に対するアパルタミドの IC_{50} は 0.88 μmol/L であった。マウス PTZ 誘発痙攣モデルを用いた試験では結論は得られなかったが，マウス及びイヌの反復投与毒性試験では，高用量のアパルタミドで痙攣が観察された。

2.6.2.1.2.3 安全性薬理試験

雄ラット 28 日間反復経口投与毒性試験で，最高 150 mg/kg/日までの用量で投与最終週に実施した FOB 検査において，アパルタミドの投与に関連した CNS への影響はみられなかった。

In vitro hERG 試験（GLP）でのアパルタミド及び代謝物 M3 の IC_{50} は，それぞれ 6.17 及び 4.56 μmol/L であったが，いずれも最高濃度 30 μmol/L まで摘出イヌプルキンエ線維における活動電位持続時間（APD）を延長しなかった。テレメトリー装着雌雄覚醒イヌでの試験（GLP）において，アパルタミドの単回経口投与は 40 mg/kg まで心血管系に対して影響を及ぼさなかった。雄ラットの呼吸系に関する安全性薬理試験（GLP）において，アパルタミド及び代謝物 M3 の 100 mg/kg までの単回経口投与により懸念されるべき所見はみられなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験として，AR に対する作用及び抗腫瘍効果を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。

2.6.2.2.1 AR に対する結合特性

【参考資料 4.2.1.1.1】

外因性野生型 AR と内因性変異型 AR（T877A）の両者を発現する LNCaP/AR（コドンスイッチ置換）[LNCaP/AR(cs)] 細胞を用いて，競合的結合試験を実施した。AR に対するアパルタミドの平衡状態での結合親和性は，^{18}F-FDHT との競合的結合を利用して測定した。アパルタミドは AR に結合し（IC_{50} = 16.0 nmol/L），その結合親和性は抗アンドロゲン薬であるビカルタミド（IC_{50} 中央値 = 160 nmol/L）より 7～10 倍高く，AR のリガンド結合部位と同じ部位に競合的に結合した（図 2.6.2-1）。

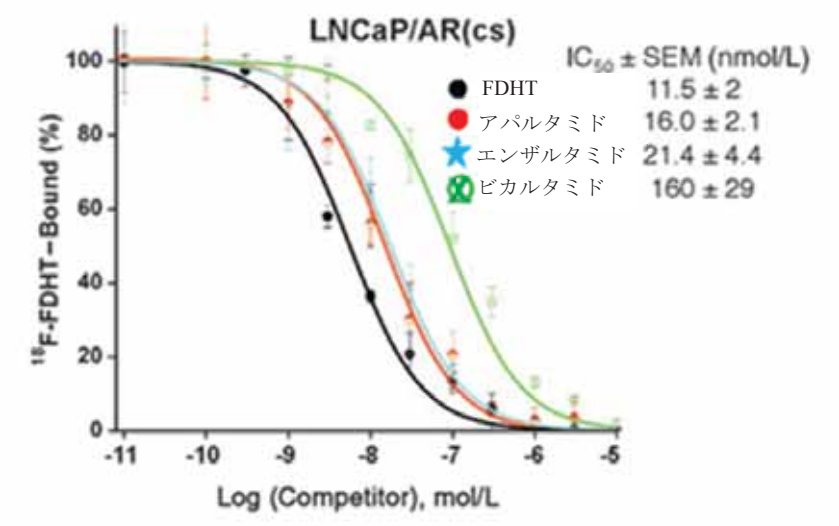


図 2.6.2-1 アパルタミドの AR に対する結合親和性

Note: Representative competitive binding assay versus ^{18}F-FDHT [LNCaP/AR(cs)]. IC_{50} values: 11.5 nmol/L (FDHT), 16.0 nmol/L (apalutamide), 21.4 nmol/L (enzalutamide), 160 nmol/L (bicalutamide).
Error bars, standard deviation (SD); n = 3.
Inset, IC_{50} values (mean ± SEM) from 5 replicate experiments.

2.6.2.2.2 AR に対する結合選択性

【参考資料 4.2.1.1.1】

AR 並びに他の核内 HR（PR，ERα 及び GR）に対するアパルタミドの結合選択性を比較するため，AR 及び PR のリガンド結合ドメイン，並びに完全長 ERα 及び GR に対するアパルタミドの結合親和性を市販の競合的結合試験キットを用い，*in vitro* で蛍光偏光を指標に測定した。各核内受容体 AR，PR，ERα 及び GR の陽性対照リガンドとして，それぞれ RU59063，プロゲステロン，エストラジオール及びデキサメタゾンを用いた。アパルタミドの核内 HR に対する結合親和性は，各試験 3 濃度で複数回測定し，各陽性対照化合物の結合親和性を 100%としたときの相対値で表した。

精製 AR，ERα，PR 及び GR を用いた *in vitro* 結合試験の結果（リガンド濃度：100 µmol/L まで検討），他の核内 HR に比べ，アパルタミドは AR に選択的に結合した（表 2.6.2-2）。ERα 及び GR に対し，アパルタミド及び RU59063 は検討した最高濃度でも結合性を示さず，結合親和性の相対値は< 0.0005 及び< 0.0002%であった。

表 2.6.2-2 アパルタミドの他の核内 HR と比較した AR に対する結合選択性

	AR	PR	ERα	GR
Apalutamide	1.2	<0.0005	<0.0005	<0.0002
RU59063[5)]	100	1.2	<0.0005	<0.0002
Progesterone[5)]	-	100	-	-
Estradilol[5)]	-	-	100	-
Dexamethasone[5)]	-	-	-	100

A dash (-) indicates that binding of the ligand was not tested in the assay

2.6.2.2.3　前立腺癌細胞の増殖に対する作用

【参考資料 4.2.1.1.1】

アパルタミドの AR シグナル阻害作用により癌細胞の増殖が抑制されるかを検討するため，前立腺癌細胞（VCaP 細胞）をアパルタミド，ビカルタミド又はエンザルタミドで処理後，生細胞数を測定した。

アパルタミド及びエンザルタミドは，VCaP 細胞の増殖を促進しなかった（図 2.6.2-2, A）。一方，合成アンドロゲンである R1881 誘発の増殖に対して，アパルタミド及びエンザルタミドは阻害作用を示した（図 2.6.2-2, B）。それに対してビカルタミドは濃度依存的に癌細胞の増殖を促進し（図 2.6.2-2, A），R1881 誘発の増殖に対しては部分的な阻害作用を示すのみであった（図 2.6.2-2, B）。

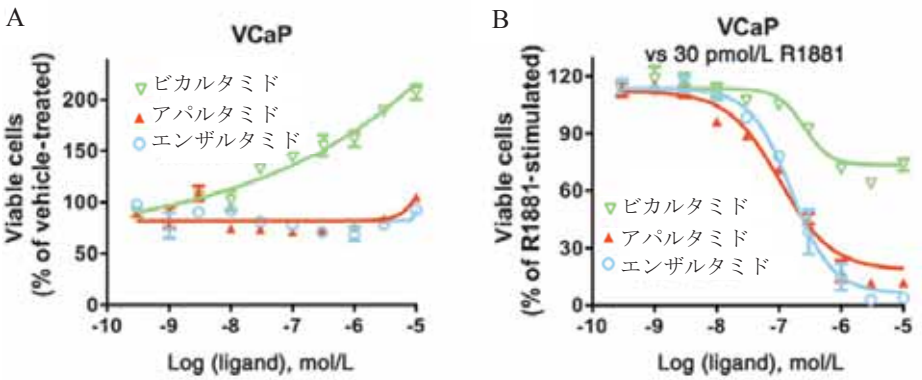


図 2.6.2-2 アパルタミド存在下での VCaP 細胞の増殖

Note: VCaP cultured (5% charcoal-stripped serum [CSS]) for 2 days, then treated for 7 days. Left, agonist mode. Right, antagonist mode with 30 pmol/L R1881. Viable cells (CellTiter-Glo) plotted as percentage of vehicle control (dimethyl sulfoxide (DMSO); n = 3, mean ± SEM)

2.6.2.2.4 AR 核内移行への作用

【参考資料 4.2.1.1.1】

AR を介する遺伝子発現において，リガンドが結合することによる細胞質から核内への AR の移行が重要である。アパルタミドが AR の核内移行を減弱し，アンドロゲン応答配列（ARE）に結合可能な核内の AR 濃度を低下させるかを検討した。強化黄色蛍光タンパク質で標識した AR（AR-EYFP）を発現する LNCaP 細胞をアパルタミド，溶媒［ジメチルスルホキシド（DMSO）］，R1881，ビカルタミド又はエンザルタミドで処理後，各細胞の細胞質及び核領域における蛍光強度を定量し，核：細胞質比を算出した。

溶媒処理細胞では，AR-EYFP は大部分が細胞質に局在した（核：細胞質比 = 0.7）のに対して，R1881 処理細胞では，AR-EYFP は主に核内へ局在した（核：細胞質比 = 29.0，図 2.6.2-3）。ビカルタミド処理細胞でも，R1881 より低レベルであるものの核内への局在がみられた（核：細胞質比 = 13.8）。対照的に，アパルタミド及びエンザルタミド処理細胞では，大半の AR-EYFP が細胞質内に留まっていた（核：細胞質比はそれぞれ 2.5 及び 3.0，図 2.6.2-3）。

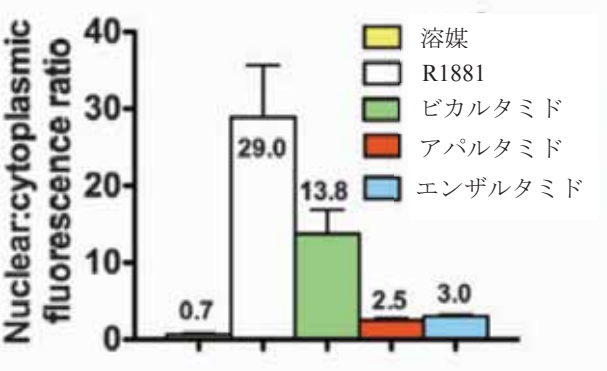


図 2.6.2-3 アパルタミドの AR 核内移行に対する作用

Note: The nuclear:cytoplasmic fluorescence intensity ratio of individual cells was quantified (n = 3, mean ± SEM).

2.6.2.2.5 AR の標的 DNA への結合に対する作用

【参考資料 4.2.1.1.1】

前立腺癌細胞において，アパルタミド処理により AR が標的 DNA のプロモーター領域へ結合して転写を阻害可能であるかを検討するため，R1881 の存在下又は非存在下で LNCaP/AR(cs)細胞をアパルタミド，ビカルタミド及びエンザルタミドで処理した後，クロマチン免疫沈降（ChIP）を実施した。

R1881 の非存在下，アパルタミド及びエンザルタミドで処理したところ，標的遺伝子である PSA 及び TMPRSS2 のエンハンサー領域に AR は結合しなかった（図 2.6.2-4）。アンタゴニスト作用を評価するための R1881 存在下での検討では，アパルタミド及びエンザルタミドは R1881 と競合してプロモーター領域への AR の結合を阻害した。対照的に，ビカルタミドは標的遺伝子への DNA 結合を誘導して部分的なアゴニスト活性を示し，R1881 によるアゴニスト作用への阻害は不十分であった。

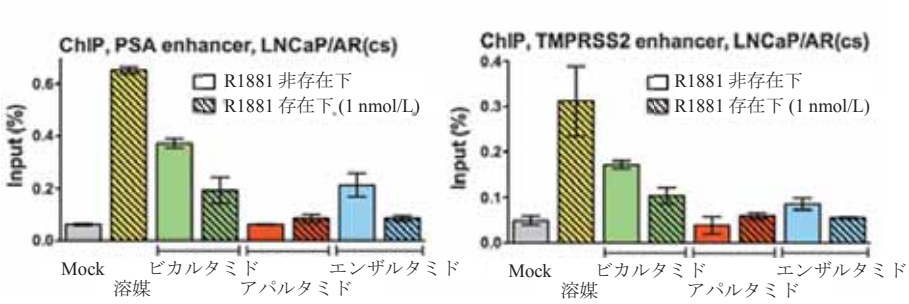


図 2.6.2-4 アパルタミドによる PSA 及び TMPRSS2 遺伝子エンハンサー領域への AR 結合の阻害

Note: ChIP of AR in LNCaP/AR(cs) cultured (5% CSS) and treated 1 hour with or without 1 nmol/L R1881 and either DMSO (Veh) or 10 µmol/L anti-androgen. RT-PCR: PSA, TMPRSS2 enhancers (mean ± SD, n = 2).

2.6.2.2.6 *In vitro* での AR 依存性遺伝子転写に対する作用

【参考資料 4.2.1.1.1】

標的 DNA のプロモーター配列への AR の結合及び遺伝子の転写活性化には，リガンド結合に伴う AR の構造変化に応答したコファクタータンパク質との相互作用が必要である。標的 DNA への結合に対するアパルタミドの作用において，変動要因となるコファクターの結合の影響を除去するため，VP16-AR 融合タンパク質及び ARE 応答性ルシフェラーゼを発現する HeP-G2 細胞を用い，アパルタミドで処理後の核内に残存する AR の DNA 結合能を直接評価した。VP16-AR は恒常的に核内に存在し，コファクタータンパク質（コアクチベーター）の結合を必要とせずに ARE を介した転写を活性化するため，リガンド誘発 DNA 結合を直接評価することが可能である。

R1881 非存在下で，ビカルタミドは Hep-G2 細胞における VP16-AR を介する転写を部分的に活性化したことから，AR の DNA 結合が示唆された（図 2.6.2-5, C）。AR 応答性ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを恒常的に組み込んだ LNCaP/AR-Luc 細胞において，検討したすべての抗アンドロゲン薬は野生型 AR を活性化しなかった（図 2.6.2-5, A）。ビカルタミドとは対照的に，アパルタミドは 10 µmoL/L まで Hep-G2 細胞における VP16-AR を介する転写を誘発しなかったことから（図 2.6.2-5, C），AR の DNA 結合に対する誘導能を持たないことが示唆された。アパルタミド及びエンザルタミドは，R1881 存在下での VP16-AR を介する転写を 0.2 µmol/L の IC_{50} で阻害したが，ビカルタミドは部分的な弱い拮抗作用を示すのみであった（IC_{50} = 0.35 µmol/L，図 2.6.2-5, D）。

これらの結果から，ChIP での検討（2.6.2.2.5 参照）と一致した結果が確認され，アパルタミドとビカルタミド間の作用機序における基本的な違いが明らかとなった。

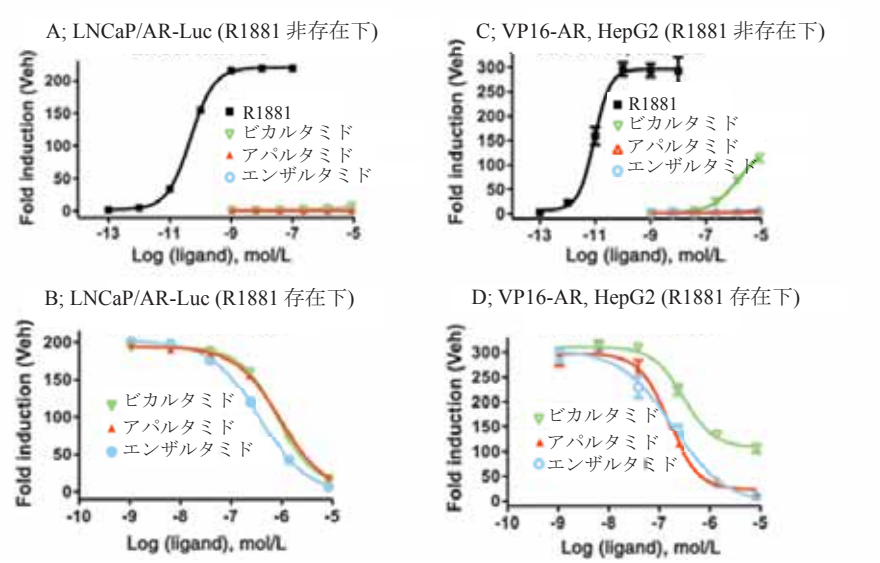


図 2.6.2-5 コファクターの結合を必要としないアパルタミドの AR 依存性遺伝子発現抑制作用

Note: Activation of an androgen-regulated 4XARE-Luc reporter gene by wild-type AR and VP16-AR in LNCaP/AR-Luc or Hep-G2 cells treated for 40 to 48 hours with or without 0.1 nmol/L R1881 and either DMSO (Veh) or anti-androgen. Luciferase assay conducted on cell lysates: light units relative to vehicle control (n = 3, mean ± SEM).

2.6.2.2.7　*In vivo* での AR 依存性遺伝子転写に対する作用

【参考資料 4.2.1.1.1】

アパルタミドの *in vivo* での薬理活性を前立腺癌モデルで検討した。LNCaP/AR-Luc 細胞［外因性 AR 及び AR 依存性プロバシン：ルシフェラーゼ（ARR2-Pb-Luc）レポーターを共発現］を異種移植した去勢雄免疫不全マウスに溶媒又はアパルタミド（10 mg/kg/日）を経口投与した。

17 日間のアパルタミド投与により，AR 応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子の転写活性（腫瘍体積で補正）は，溶媒投与群と比較して低下したことから，アパルタミドによる *in vivo* での AR 依存性遺伝子転写に対する阻害作用が示された（図 2.6.2-6）。

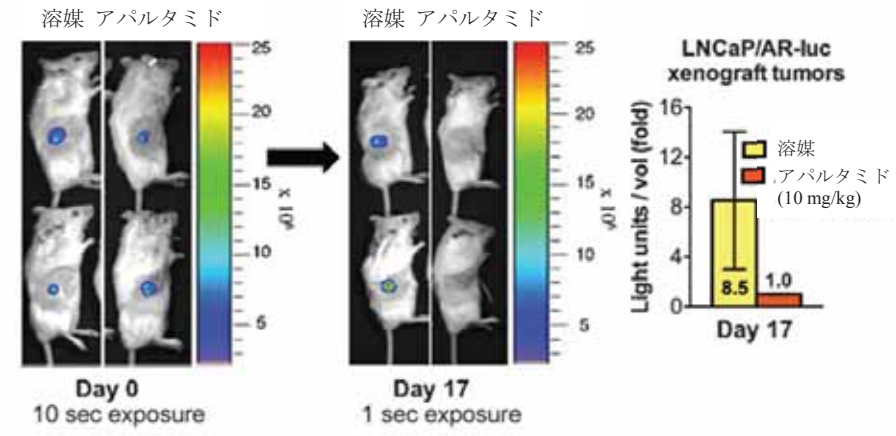


図 2.6.2-6 *in vivo* における AR 依存性遺伝子転写に対するアパルタミドの阻害作用

Note: Luciferase imaging of castrated male mice harboring LNCaP/AR-Luc tumors pretreatment (Day 0) and posttreatment (Day 17), normalized to tumor volume.

2.6.2.2.8 *In vivo* 抗腫瘍効果

【参考資料 4.2.1.1.1 並びに評価資料 4.2.1.1.2，4.2.1.1.3 及び 4.2.1.1.4】

去勢マウスに LNCaP/AR(cs)細胞を異種移植したモデルにおいて，アパルタミド（10 mg/kg/日，28 日間連日経口投与）の抗腫瘍効果をビカルタミド（10 mg/kg/日，28 日間連日経口投与）と比較した（4.2.1.1.1）。

投与 28 日目において，溶媒投与群では 9 例中 7 例で投与開始時に比べて腫瘍体積が増加した。本モデルにおけるビカルタミドの抗腫瘍効果は腫瘍退縮よりも主に増殖抑制に限定され，50%以上の腫瘍退縮を示した動物は 10 例中 1 例のみであった。これに対して，アパルタミド投与群では 10 例中 8 例の腫瘍で 50%以上の腫瘍退縮がみられ，うち 2 例は触知不能な大きさまで退縮していた（図 2.6.2-7, A）。この試験において，アパルタミドの定常状態での血漿中濃度はビカルタミドの約 1/3 の低濃度であったにも関わらず（28 日目の投与 24 時間後の血漿中濃度はアパルタミドで 9.69 μg/mL，ビカルタミドで 30.74 μg/mL），ビカルタミドよりも強い抗腫瘍効果が得られた。さらに溶媒投与群に比べ，アパルタミド投与群の腫瘍では Ki-67 染色を指標とした増殖は約 60%低下し（図 2.6.2-7, B），TUNEL を指標としたアポトーシス率は約 10 倍上昇した（図 2.6.2-7, C）。

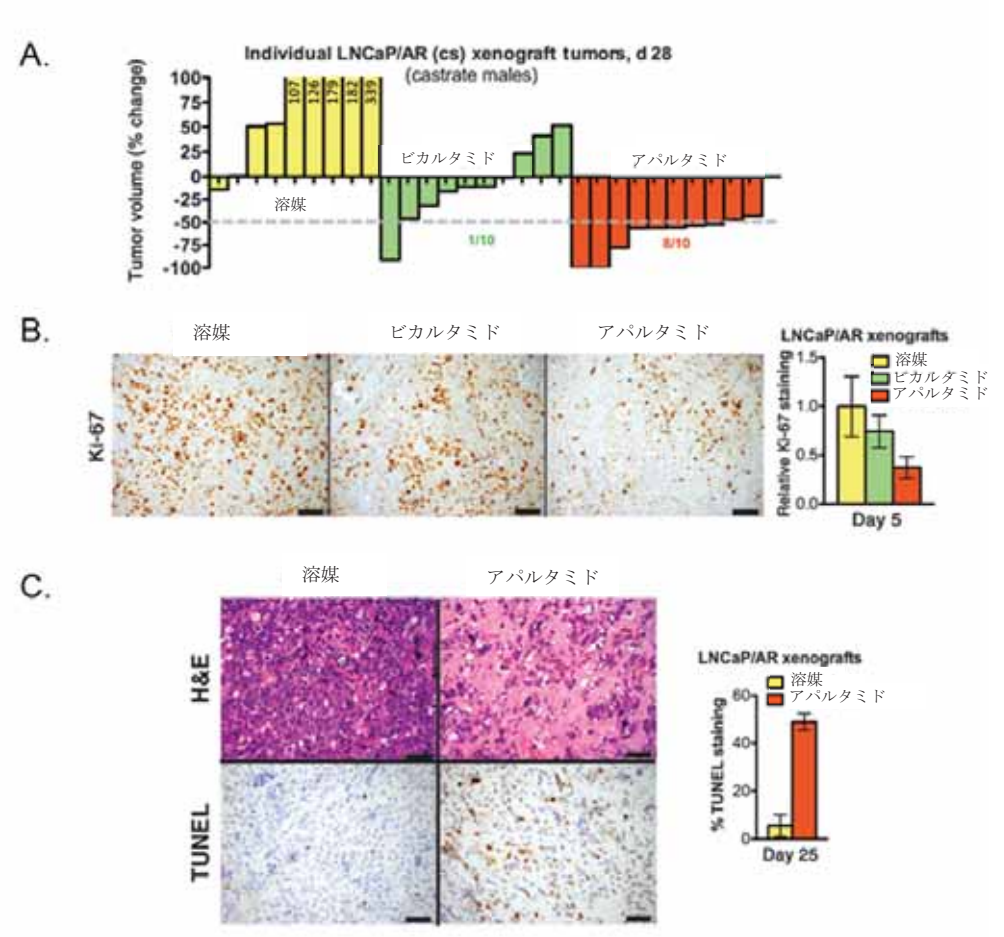


図 2.6.2-7 マウス異種移植前立腺癌モデルにおけるアパルタミドの抗腫瘍効果

Note: A, Castrated male mice bearing LNCaP/AR(cs) tumors (mean tumor volume, 200 mm^3) treated by daily gavage with vehicle or drug (10 mg/kg/day). Percentage of change in individual tumor volume (9–10 tumors per treatment group) after 28 days. Unpaired *t*-test: vehicle versus apalutamide, P = 0.0001; vehicle versus bicalutamide, P = 0.004; apalutamide versus bicalutamide, P = 0.002. Plasma concentrations measured 24 hours postdose on Day 28 (mean ± SEM: bicalutamide, 30.74 ± 3.68; apalutamide, 9.69 ± 1.58). B, Castrated male mice bearing LNCaP/AR tumors more than 100 mm^3 treated 5 days by daily gavage with vehicle or 10 mg/kg/day anti-androgen. Ki-67 immunohistochemistry carried out on tumor tissue resected 2 hours after final dose. Number positively stained cells calculated out of 300 cells counted in each of 5 random views (n = 3 tumors per treatment group) and expressed relative to vehicle controls [error, SD; Veh vs. apalutamide and bicalutamide vs. apalutamide, P > 0.05 (1-way ANOVA with the Bonferroni posttest)]. C, Castrated male mice bearing LNCaP/AR tumors treated as in (B) for 25 days. TUNEL staining carried out on tumor tissue resected after final dose. Number positively stained cells calculated out of 300 cells counted in each of 5 random views (n = 3 tumors per treatment group), expressed relative to vehicle controls (error, SD).

去勢マウスに LNCaP/AR(cs)細胞を異種移植したモデルにおいて，アパルタミドの抗腫瘍効果をエンザルタミドと比較した（4.2.1.1.1）。アパルタミド又はエンザルタミドは 30 及び 100 mg/kg/日の用量で 28 日間，連日経口投与した。

アパルタミド（30 mg/kg/日）投与群では，投与 28 日目において 50%を超える腫瘍退縮がみられた動物が 20 例中 13 例であったのに対して，エンザルタミド（30 mg/kg/日）投与群では，19 例中 3 例のみであった（$P < 0.05$（unpaired *t*-test），図 2.6.2-8）。エンザルタミドの高用量群（100 mg/kg/日）では効果は増大し，19 例中 12 例で 50%を超える腫瘍退縮がみられた。それに対して，アパルタミドの高用量群（100 mg/kg/日）では，50%を超える腫瘍退縮がみられた動物は 19 例中 13 例であり，30 mg/kg/日投与群を超える効果は認められなかった。別試験として実施

したマウスの単回投与薬物動態試験では，アパルタミド及びエンザルタミドはともに 30～100 mg/kg で用量依存的な曝露量の増加がみられたが（4.2.1.1.1，Supplementary Table S5），本モデルにおける 100 mg/kg/日での両被験薬の抗腫瘍効果に差はみられなかった。

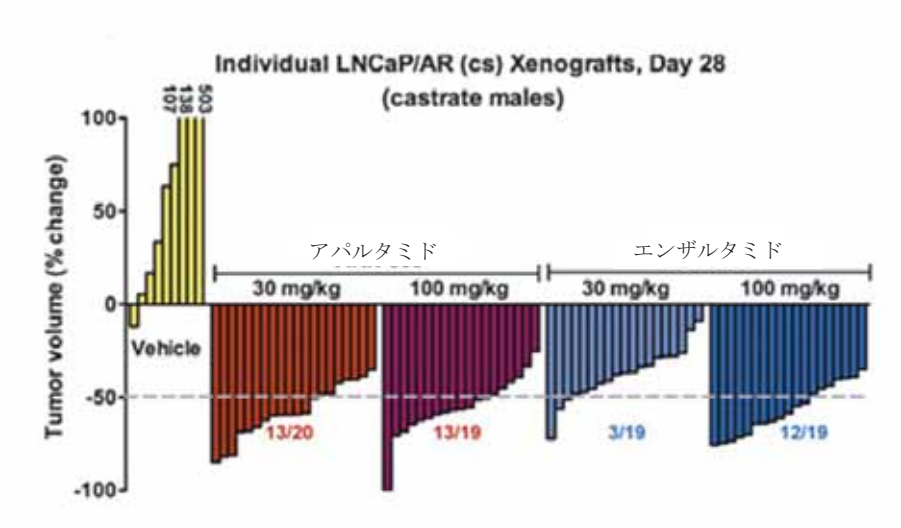


図 2.6.2-8 マウス異種移植前立腺癌モデルにおけるアパルタミド及びエンザルタミドの抗腫瘍効果の比較

Note: 30 and 100 mg/kg dose: percentage of change in individual tumor volume (n = 19–20 tumors per treatment group) after 28-day treatment. $P < 0.05$, drug versus vehicle or apalutamide 30 mg/kg/day versus enzalutamide 30 mg/kg/day.

同様に，去勢マウスに LNCaP/AR(cs)細胞を異種移植したモデルにおいて，*in vivo* におけるアパルタミドの抗腫瘍効果を複数用量（1，10，30 及び 100 mg/kg/日，28，29 又は 42 日間連日経口投与）で別途実施した（4.2.1.1.2，4.2.1.1.3，4.2.1.1.4）。

アパルタミド及びエンザルタミドをいずれも 10 及び 30 mg/kg/日で 42 日間連日経口投与した検討（4.2.1.1.3）では，最終投与後に測定したアパルタミドの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）が同用量のエンザルタミドの約 1/4 にもかかわらず，腫瘍の増殖曲線の推移から両被験薬は同等の抗腫瘍効果を示すことが確認された（図 2.6.2-9）。

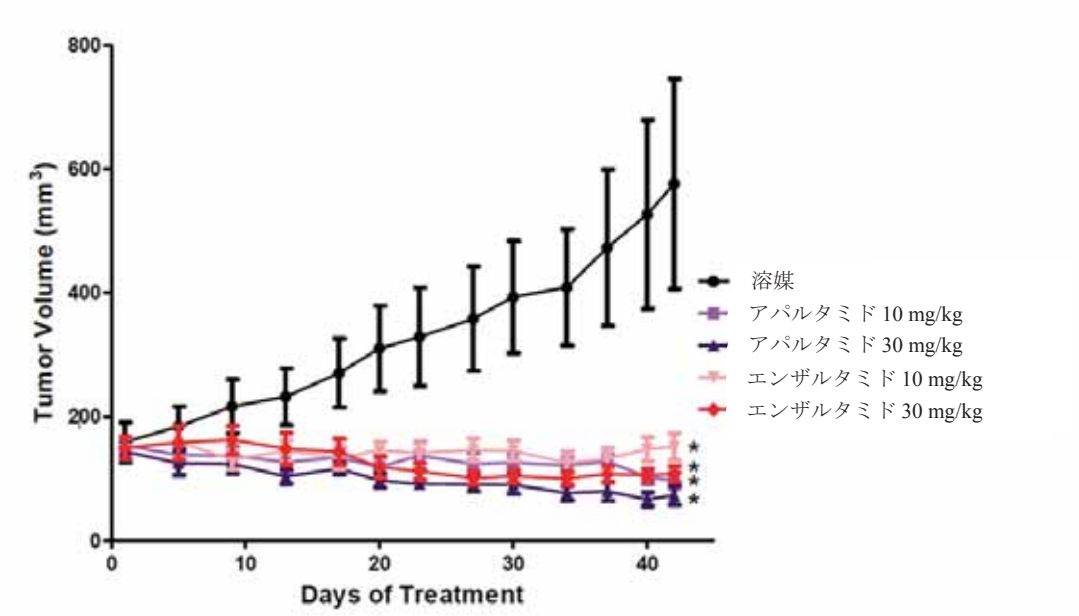


図 2.6.2-9 マウス LNCaP/AR(cs)細胞異種移植前立腺癌モデルにおける
アパルタミド（10 及び 30 mg/kg/日）投与による増殖曲線

Note: Tumor bearing animals were dosed with apalutamide and enzalutamide at 10 and 30 mg/kg/day. Tumor volumes were measured twice per week for 42 days. *Significantly different from vehicle with 1-way ANOVA and Dunnetts Multiple Comparison Test (4.2.1.1.3).

2.6.2.2.9 *In vivo* での抗アンドロゲン作用

【評価資料 4.2.3.2.4，4.2.3.2.11】

非去勢雄ラット及びイヌのアンドロゲン依存性生殖器に対するアパルタミドの薬理作用を，毒性試験の一部として検討した。雄ラット 26 週間及び雄イヌ 39 週間反復経口投与毒性試験において，アパルタミドは雄生殖器に対して抗アンドロゲン作用を示した。

雄ラットにおいては，25 mg/kg/日以上の投与で，前立腺，精嚢及び精巣上体の萎縮，精巣の変性，精巣間細胞の過形成がみられた【2.6.6.3.1.4 参照】。

雄イヌにおいては，2.5 mg/kg/日以上の投与で，前立腺及び精巣上体の萎縮，精細管の変性／萎縮（精子低形成を含む）及び精巣間細胞肥大がみられた【2.6.6.3.3.4 参照】。

2.6.2.2.10 代謝物の薬理作用

【評価資料 4.2.1.1.5，4.2.1.1.6】

動物で同定されている 4 種類のアパルタミド代謝物（代謝物 M1，M2，M3 及び M4）【2.6.4.5 参照】の AR に対する作用を，LNCaP/AR-Luc 細胞及び VP16-AR 発現 HepG2 細胞を用いた AR 依存性転写を指標に検討した。

代謝物 M1，M2 及び M4 の AR に対する作用はアパルタミドの約 1/30 以下であった（4.2.1.1.5，4.2.1.1.6）。4 種類のアパルタミド代謝物のうち代謝物 M3 の AR に対する阻害作用が最も強かったが，その阻害作用はアパルタミドの約 1/3 であった（4.2.1.1.5）。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 *In vitro* 受容体結合試験

【評価資料 4.2.1.2.1，4.2.1.2.2，4.2.1.2.3，4.2.1.2.4 及び 4.2.1.2.5】

アパルタミドのオフターゲットに対する相互作用を検討するため，55 種類の受容体，イオンチャネル及び神経伝達物質トランスポーターを用いて結合試験を実施した（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3 アパルタミドの評価に用いた結合試験の一覧

Receptors	Adensine A_1	Adensine A_{2A}	Adensine A_3	Adrenergic α_1	Adrenergic α_2
	Adrenergic β_1	Adrenergic β_2	Angiotensin II AT_1	Bradykinin B_2	Cannabinoid CB_1
	Chemokine CXCR2	Chemokine CCR1	Cholecystokinin CCK_1	Dopamine D_1	Dopamine D_{2S}
	Endothelin ET_A	GABA (non-selective)	GABA, BZD (central)	Gallamine GAL_2	Histamine H_1
	Histamine H_2	Melanocortin MC_4	Melatonin MT_1	Muscarinic M_1	Muscarinic M_2
	Muscarinic M_3	Neurokinin NK_2	Neurokinin NK_3	Neuropeptide Y Y_1	Neuropeptide Y Y_2
	Neurotensin NTS_1	Opiate $delta_2$	Opiate kappa	Opiate mu	Opiate NOP
	Prostanoid TP	Serotonin 5-HT_{1A}	Serotonin 5-HT_{1B}	Serotonin 5-HT_{2A}	Serotonin 5-HT_{2B}
	Serotonin 5-HT_3	Serotonin 5-HT_{5A}	Serotonin 5-HT_6	Serotonin 5-HT_7	Somatostatin sst
	Vasoactive intestinal peptide $VPAC_1$	Vasopressin V_{1a}			
Ion Channels	Ca^{2+} channel (L, verapamil site)	K_V channel	SK_{Ca} channel	Na^+ channel (site 2)	Cl^- channel (GABA-gated)
Neurotransmitter transporters	Norepinephrine transporter	Dopamine transporter	5-HT transporter		

アパルタミド（10 μmol/L）は，$GABA_A$ 受容体（対照の特異的結合を 67%阻害）を除き，すべてのオフターゲットに対して有意な相互作用を示さなかった（対照の特異的結合に対する阻害はすべて 50%未満）（4.2.1.2.1）。さらに，濃度依存性を検討した結果，アパルタミドは 3.0 μmol/L の IC_{50} で GABA 開口性クロライドチャネルへのリガンド結合を阻害した（4.2.1.2.2）。また，モルモット回腸を用いた *in vitro* 機能性試験において，$GABA_A$ 受容体に対するアンタゴニスト活性を検討したところ，アパルタミドは 0.88 μmol/L の IC_{50} で阻害作用を示した（4.2.1.2.3）。

アパルタミド代謝物【4.2.2.4.1】の GABA 開口性クロライドチャネルに対する作用を検討したところ，代謝物 M1 は 10 μmol/L で 10%の阻害のみ示し（4.2.1.2.4），代謝物 M2，M3 及び M4 はそれぞれ 19，3.2 及び 25 μmol/L の IC_{50} で阻害作用を示した（4.2.1.2.5）。

2.6.2.3.2 *In vivo* での痙攣誘発性

【評価資料 4.2.1.2.6】

アパルタミドの *in vivo* での痙攣誘発性について，マウス PTZ 誘発痙攣モデルを用いて検討した。PTZ は GABA 受容体アンタゴニストであり，マウスに投与するとミオクローヌス痙攣を誘発する。PTZ の痙攣誘発閾値に対するアパルタミド前投与の影響を検討するため，マウスに PTZ を持続静注し，前立腺癌患者において痙攣誘発が報告されているエンザルタミドを対照薬に加え，下記の 3 試験を実施した。

第 1 試験では，1 群 8 例にエンザルタミドを単独で最高 100 mg/kg まで投与したところ，100 mg/kg で PTZ 誘発の痙攣閾値が統計学的に有意に低下したことから，PTZ 誘発痙攣モデルを用いた評価の妥当性が示された。

第 2 試験では，例数を増加した比較試験（1 群 12 例）を実施し，アパルタミド及びエンザルタミドを最高 300 mg/kg まで投与して評価した。この試験において，アパルタミドはいずれの用量でも PTZ の痙攣閾値を低下させなかったのに対し，エンザルタミドは，第 1 試験と同様に 100 mg/kg 以上で痙攣閾値を低下させた。しかし，第 2 試験は，i）第 1 試験よりも溶媒投与群における閾値が低下した｛痙攣誘発時の PTZ 用量［mean ± 標準偏差（SD）］，第 1 試験；189 ± 71 mg/kg，第 2 試験；81.9 ± 34.9 mg/kg｝，ii）エンザルタミド及びアパルタミドの用量を 100 mg/kg から 300 mg/kg に増加させても曝露量の増加がみられなかった，iii）8 例で実施した第 1 試験に比べて 12 例で実施した第 2 試験の方が強直性痙攣閾値のばらつき（CV%）が大きく，一定の解釈が得られなかった。

第 3 試験として，新しい溶媒[1]を用い，同様のデザインの比較試験（1 群 12 例，最高 300 mg/kg までの用量）を実施した。その結果，第 2 試験と対照的に，アパルタミドは 300 mg/kg で痙攣閾値を有意に低下させ，エンザルタミドは第 1 及び第 2 試験で痙攣閾値を低下させた用量（血漿中及び脳内濃度でも同様）で痙攣閾値を低下させなかった。

上記 3 試験における溶媒群の痙攣閾値の変動及び陽性対照であるエンザルタミドの再現性の点から，PTZ 誘発痙攣モデルでのアパルタミドの痙攣誘発性は評価出来なかった。

マウス PTZ 誘発痙攣モデルを用いた試験では明確な結論は得られなかったが，マウス及びイヌの反復投与毒性試験において，高用量のアパルタミドの投与により痙攣が認められている。雄イヌの 21 日間反復経口投与毒性試験及び 28 日間反復経口投与毒性試験において，高用量群に振戦及び痙攣が観察された。21 日間の試験では，40 mg/kg/日投与群の 2 例の動物で痙攣が発現したため，投与 13 及び 14 日目に安楽死させた【2.6.6.3.3.1 参照】。28 日間の試験では，25 mg/kg/日投与群で投与 7，8 及び 9 日目に各 1 例ずつ，痙攣が発現したため投与 9 日目までに安楽死させた【2.6.6.3.3.2 参照】。これらのイヌには神経学的な症状／瀕死状態に関連した剖検所見及び病理組織学的変化は認められなかった。雌雄マウスの予備的毒性試験（単回投与及び 10 日間反復経口投与試験）においては，振戦，痙攣及び活動性低下が観察された。175 mg/kg/日投与群の 6 例中 1 例の雌マウスに，0 日目で間代性痙攣及び活動性低下が認められ 1 日目に死亡した【2.6.6.5.2.2 参照】。また，500 mg/kg の単回投与により，6 例中 2 例の雌マウスに振戦，痙攣又は活動性低下がみられ死亡した【2.6.6.5.2.1 参照】。

雄イヌの 13 及び 39 週間反復経口投与毒性試験並びに雌イヌの 13 週間反復経口投与毒性試験において，最高 10 mg/kg/日までの用量で，中枢神経系への影響はみられなかった【2.6.6.3.3.3，2.6.6.3.3.4 及び 2.6.6.3.4.2 参照】。雄ラットの 28 日間反復経口投与毒性試験においては，最高 150 mg/kg/日までの用量で，FOB 検査において投与に関連した変化はみられなかった（2.6.2.4.1 参照）。

[1] 第1及び第2試験［18% PEG-400，1% Tween-80，1%ポリビニルピロリドン（PVP）k28-32及び15% VitE-TPGS］，第3試験（31.5% PEG-400，1.75% Tween-80，1.75% PVP k28-32及び15% VitE-TPGS）
上記をそれぞれ0.5% カルボキシメチルセルロース（CMC）含有20 mmol/Lクエン酸緩衝液に溶解した水溶性懸濁液（pH 3）

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 中枢神経系に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.1】

中枢神経系に及ぼす影響を検討するため，雄ラット 28 日間反復経口投与毒性試験に FOB 検査を組み込んで実施した【2.6.6.3.1.2.参照】。ラット（1 群 10～15 例）にアパルタミド 0（溶媒），50，150 及び 250 mg/kg/日を 28 日間，1 日 1 回経口投与した。また，各群 3～9 例を追加して，アパルタミドのトキシコキネティクス（TK）評価を行った。この試験では，代謝物 M3 濃度の検討は行わなかった。FOB 検査（ケージ内観察，ハンドリングによる観察，オープンフィールド観察，操作試験及び自発運動量の評価）を投与前及び投与最終週に主試験での生存動物すべてで実施した。投与から評価開始までの時間は設定しなかった。

高用量群（250 mg/kg/日）では死亡がみられたため 4 日目で投与を中止し，生存動物は安楽死させた。中間用量群（150 mg/kg/日）では，主試験で 15 例中 2 例が死亡し，TK 試験で 9 例中 3 例が 3～13 日目の間に死亡するか又は安楽死させた。250 mg/kg/日群の安楽死前の動物では，立毛，異常呼吸，体温下降，脱水及び活動性低下の所見が認められた。死亡動物には全般的に死亡前に一般状態の悪化はみられず，痙攣のような CNS 症状も認められなかったが，夜間に死亡した動物では観察を実施していなかったため，そのような症状を検出できなかった可能性は否定できない。死亡動物に死因は特定されなかった。

結果として，FOB 検査の評価において投与に関連した変化は認められなかった。FOB 検査を実施した最高用量である 150 mg/kg/日で，アパルタミドの定常状態（28 日目）での最高血漿中濃度（C_{max}）は 31.5 µg/mL であった。

2.6.2.4.2 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 *In vitro* 試験

(1) hERG 電流に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.2】

hERG を安定導入したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）-K1 細胞を用い，アパルタミド及び代謝物 M3 の室温での hERG チャネルに対する作用をホールセルパッチクランプ法で検討した。アパルタミド（遊離塩基体）及び代謝物 M3 を 0［溶媒；0.3% (v/v) DMSO 含有 Tyrode 液］，1，3，10 及び 30 µmol/L の濃度で作用させた（名目濃度）。試験時に被験物濃度を測定し，CHO-K1 細胞が実際に曝露された濃度を確認した。

試験時の実際のアパルタミド濃度は 0.407，1.33，4.52 及び 14.4 µmol/L であり，アパルタミドは 1.33～14.4 µmol/L で有意に hERG 電流を抑制し，IC_{50} は 6.17 µmol/L と推定された。無作用濃度は測定した最低濃度である 0.407 µmol/L と考えられた。代謝物 M3 の実際の濃度は 0.406，1.29，4.05 及び 13.5 µmol/L であり，全濃度で有意な hERG 電流に対する抑制作用を示し，IC_{50} は 4.56 µmol/L と推定された。アパルタミド及び代謝物 M3 の試験において，陽性対照であるアステミゾール（5 nmol/L）は hERG 電流をそれぞれ 43.3 及び 60.1%阻害し，30 nmol/L でいずれも 100%阻害した。

(2) 摘出イヌ心筋プルキンエ線維に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.3】

心筋活動電位に対するアパルタミド及び代謝物 M3 の作用を，イヌ心室から単離したプルキンエ線維を用いて *in vitro* で検討した。アパルタミド（遊離塩基体）及び代謝物 M3 を 0［溶媒；0.3% DMSO 含有プルキンエ線維用 Tyrodes（PFT）液］，3，10 及び 30 μmol/L の名目濃度で線維標本（4 例）に漸増濃度で添加後，3 種の基本サイクル間隔（BCL，2，1 及び 0.5 秒）で電気刺激を行い，活動電位への影響を溶媒対照と比較した。両被験化合物の最高濃度は溶媒への溶解濃度上限である 30 μmol/L とした。

アパルタミドは 3，10 及び 30 μmol/L で 60 及び 90%再分極時の活動電位持続時間（それぞれ APD_{60} 及び APD_{90}），静止膜電位（RMP）及び最大脱分極速度（V_{max}）に有意な影響を及ぼさなかった。2 秒間の BCL での活動電位振幅（APA）は，3 及び 10 μmol/L でのみ有意に短縮したが（平均値でそれぞれ 0.5 及び-1.7 mV），濃度依存性がみられなかったことから，これらの変化の生物学的意義は低いと考えられる。なお，0.5 及び 1 秒間の BCL では，アパルタミドは 3，10 及び 30 μmol/L のいずれの濃度でも，APA に対して有意な影響を示さなかった。

代謝物 M3 は 3，10 及び 30 μmol/L で，すべての BCL でのいずれの活動電位パラメータ（APD_{60}，APD_{90}，APA，RMP 及び V_{max}）に対しても有意な影響を及ぼさなかった。

陽性対照薬であるソタロールは 100 μmol/L で，いずれの BCL でも APD_{60} 及び APD_{90} を有意に延長した。

2.6.2.4.2.2 *In vivo* 試験

(1) 覚醒イヌの心血管系に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.4】

アパルタミドの心血管系への影響は，テレメトリー装着覚醒イヌ（雌雄各 3 例）にアパルタミド溶液［0（溶媒），10，20 及び 40 mg/kg］を充填したカプセルを，少なくとも 13 日間の間隔を置いて漸増用量で単回経口投与して検討した。心血管パラメータとして，血圧（収縮期圧，拡張期圧及び平均血圧），心拍数（血圧データ由来），体温，第Ⅱ誘導心電図（ECG）の各間隔［PR，QRS，QT，QTcR（心拍数補正 QT），QTcB（Bazett の式で補正した QT），QTcF（Fridericia の式で補正した QT）及び QTcV（Van de Water の式で補正した QT）］及び ECG 波形をモニターした。心血管系パラメータの記録は，各投与の少なくとも 90 分前に開始し，投与後 24 時間以上継続した。血液サンプルは投与前，投与 5 時間後［アパルタミド投与での最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）付近【2.6.4.3.1.3 参照】］及び 25 時間後に採取し，アパルタミド及び代謝物 M3 の血漿中濃度を測定した。

アパルタミドを投与したすべてのイヌで流涎がみられた。20 mg/kg 投与群の 1 例で歯茎及び耳介の蒼白，並びに四肢の冷えが，40 mg/kg 投与群の 1 例で白い泡状の嘔吐及び液状便がみられた。アパルタミドはいずれの用量においても，血圧，心拍数，体温，第Ⅱ誘導 ECG の各間隔及び ECG 波形に投与に関連した影響を及ぼさなかった。また，定性的な解析において，いずれの用量でも性差は観察されなかった。

アパルタミドの 10，20 及び 40 mg/kg の投与 5 時間後の血漿中濃度（C_{5h}）の平均値は，雄でそれぞれ 3.20，5.35 及び 10.2 μg/mL であり，雌でそれぞれ 1.18，2.32 及び 7.19 μg/mL であった。

また，アパルタミドの 10，20 及び 40 mg/kg 投与後の代謝物 M3 の C_{5h} の平均値は，雄で 0.154，0.410 及び 0.512 μg/mL，雌で 0.137，0.295 及び 0.565 μg/mL であった。アパルタミドの 40 mg/kg 投与 25 時間後の血漿中濃度（C_{25h}）の平均値は，雄で 8.52，雌で 5.58 μg/mL であり，代謝物 M3 の C_{25h} は，平均で雄 2.12，雌 1.73 μg/mL であった。したがって，代謝物 M3 の曝露量は投与 5 時間後より投与 25 時間後の方が高いことが示された。

また，雄イヌ 28 日間，13 及び 39 週間，並びに雌イヌ 13 週間反復経口投与毒性試験において，10 mg/kg/日の用量まで ECG パラメータにアパルタミドの投与に関連した変化は認められなかった【2.6.6.3.3 参照】。

2.6.2.4.3 呼吸系に及ぼす影響

【評価資料 4.2.1.3.5】

アパルタミド及び代謝物 M3 の呼吸系に及ぼす影響は，雄ラット（1 群 6 例）にアパルタミド及び代謝物 M3 を 0（溶媒），25，50 及び 100 mg/kg で単回経口投与し，投与前約 30 分間，並びに投与 8，12 及び 72 時間後（ラットでのアパルタミド及び代謝物 M3 の t_{max} はおおむね 8～12 時間【2.6.4.3.1.2 参照】）に呼吸パラメータ（1 回換気量，呼吸数及び分時換気量）を測定して検討した。この試験では TK パラメータは測定しなかった。

試験を通して死亡はみられなかった。溶媒対照群を含め全用量群において，同程度の頻度で流涎及び被毛の乱れが認められた。

アパルタミドの全用量群で，投与 8 及び 12 時間後に投与前と比較して呼吸数の軽度の低下がみられた。25 mg/kg での呼吸数の低下は 1 回換気量の上昇によって代償され，総肺換気量（分時換気量）は影響を受けなかった。50 及び 100 mg/kg では 1 回換気量の有意な代償的上昇はみられず，呼吸数の低下は総肺換気量の軽度の低下（9～14%）を引き起こした。投与 72 時間後までには，すべてのパラメータは正常レベルに回復した。

代謝物 M3 の全用量群で，投与 8 及び 12 時間後に投与前と比較して呼吸数の軽度の低下がみられた。25 及び 100 mg/kg では 1 回換気量が代償的に上昇し，総肺換気量（分時換気量）に投与に関連した影響はみられなかった。50 mg/kg では 1 回換気量の代償的上昇はみられず，呼吸数の低下は総肺換気量の軽度の低下（15～20%）を引き起こした。投与 72 時間後までには，すべてのパラメータは正常レベルに回復した。

結論として，アパルタミド及び代謝物 M3 の 25，50 及び 100 mg/kg の単回経口投与により呼吸数は低下したが，一貫した 1 回換気量の代償的上昇はみられなかった。また，総肺換気量の変化は全体的に小さかったことから，この変化は生物学的に意義がない変化であると考えられる。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

2.6.2.6.1.1 *In vitro* 試験

アパルタミドは，第一世代の AR 阻害薬であるビカルタミドの約 10 倍の結合親和性で AR に直接結合し，他の核内 HR（PR，ERα 及び GR）への結合と比較して AR に選択的に結合した（2.6.2.2.1 及び 2.6.2.2.2 参照）。ビカルタミドとは異なり，アパルタミドは合成アンドロゲンである R1881 の非存在下で AR に対してアゴニスト活性を示さなかった（2.6.2.2.3 参照）。アパルタミドは LNCaP 細胞において AR の核内移行をほとんど認めず，LNCaP/AR(cs)細胞において AR 依存性遺伝子のエンハンサーへの AR 結合を阻害した（2.6.2.2.4 及び 2.6.2.2.5 参照）。さらに，アパルタミドはルシフェラーゼレポーターコンストラクトを用いた試験において，AR 依存性遺伝子転写を抑制した（2.6.2.2.6 参照）。

このような *in vitro* 試験の結果から，アパルタミドは AR のリガンド結合部位に結合し，AR の核内移行，標的 DNA への結合及び AR 依存性遺伝子の転写活性化を阻害することが示された。アパルタミドは第一世代の AR 阻害薬，ビカルタミドよりも効力が強く，ビカルタミドでみられるアゴニスト活性を有さなかった。また，アパルタミドはエンザルタミドと同様の作用及び効力を有する薬剤であることが示された。

ヒト血漿中主要代謝物である M3 は，AR に対する結合親和性がアパルタミドの約 1/3 であった。

2.6.2.6.1.2 *In vivo* 試験

ルシフェラーゼレポーターを発現させた LNCaP/AR-Luc 細胞の異種移植マウスモデルにおいて，アパルタミドは *in vivo* での AR 依存性遺伝子転写を阻害した（2.6.2.2.7 参照）。また，アパルタミドは LNCaP/AR(cs)細胞の異種移植マウスモデルにおいて強い抗腫瘍効果を示し，ビカルタミドの抗腫瘍効果が腫瘍退縮よりも主に増殖抑制に限定されていたのに対して，アパルタミドでは，大部分の動物において 50%を超える腫瘍退縮効果を示した。LNCaP/AR(cs)細胞の異種移植マウスモデルにおいて，複数の独立した試験で複数用量（1，10，30 及び 100 mg/kg/日）を検討し，アパルタミドの抗腫瘍効果が確認された。また，これら試験においてエンザルタミドと比較した結果，両薬物とも抗腫瘍効果を示し，30 mg/kg/日で 50%を超える腫瘍退縮効果を示す動物数を直接比較すると，アパルタミドはエンザルタミドより高い効力を示した（2.6.2.2.8 参照）。

腫瘍移植モデルにおける効果に加え，雄ラット及びイヌの毒性試験の一環として薬理作用を評価したときに，アパルタミドは雄性生殖器に対し抗アンドロゲン作用を示した。

以上のように，*in vitro* 及び *in vivo* での効力を裏付ける試験での評価により，アパルタミドは強い抗腫瘍効果を持つ AR 選択的阻害薬であることが明らかになった。

2.6.2.6.2 副次的及び安全性薬理試験

2.6.2.6.2.1 臨床用量と曝露量

アパルタミドの臨床推奨用量である 240 mg/日を CRPC 患者に投与した時の定常状態におけるアパルタミド及び代謝物 M3 の薬物動態パラメータ［C_{max} 及び 0 時間から 24 時間までの AUC

（$AUC_{0\text{-}24h}$）］は，外国人第 Ib 相 QT/QTc 試験及び日本人第 I 相試験で得られている（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4 CRPC 患者にアパルタミドの 240 mg/日を投与した時の定常状態での アパルタミド及び代謝物 M3 の薬物動態パラメータ（平均値）

Clinical Dose	Apalutamide		Metabolite JNJ-56142060 (M3)	
	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$(μg･h/mL)	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$(μg･h/mL)
240 mg/day (non-Japanese)[a]	5.95	100	5.85	124
240 mg/day (Japanese)[b]	7.57	122	7.11	150

[a] Phase 1b QT/QTc Study, 240 mg/day, Cycle 3, Day 1, N = 43 (Mod5.3.4.2.1\56021927PCR1019) (non-Japanese)
[b] Phase 1 Study, 240 mg/day, Cycle 1, Day 22, N = 6 (Mod5.3.5.2.2\56021927PCR1008) (Japanese)

定常状態での外国人及び日本人におけるアパルタミドの平均 C_{max} はそれぞれ 5.95 μg/mL（12.5 μmol/L）及び 7.57 μg/mL（15.9 μmol/L），代謝物 M3 の平均 C_{max} はそれぞれ 5.85 μg/mL（12.6 μmol/L）及び 7.11 μg/mL（15.3 μmol/L）であった。ヒト血漿中で，アパルタミド及び代謝物 M3 の非結合型分率はそれぞれ 4.2 及び 5.1%であった【2.6.4.4.2.1 参照】。したがって，外国人及び日本人におけるアパルタミドの非結合型濃度の平均 C_{max} はそれぞれ 0.250 μg/mL（0.52 μmol/L）及び 0.318 μg/mL（0.67 μmol/L），代謝物 M3 の非結合型濃度の平均 C_{max} はそれぞれ 0.298 μg/mL（0.64 μmol/L）及び 0.363 μg/mL（0.78 μmol/L）であった。これらのアパルタミド及び代謝物 M3 の総濃度及び非結合型濃度を用いて，*in vitro* 及び *in vivo* 試験において求めた平均の IC_{50} と C_{max} を比較した。

2.6.2.6.2.2　中枢神経系に関する評価

アパルタミド及び代謝物 M3 は，放射性標識リガンドの結合をそれぞれ 3.0 及び 3.2 μmol/L の IC_{50} で阻害する，GABA 開口性クロライドチャネルの阻害物質であることが示された。組織を用いた機能性試験での $GABA_A$ 受容体に対するアパルタミドの IC_{50} は 0.88 μmol/L であった（2.6.2.3.1 参照）。GABA 開口性クロライドチャネルは種々な分子によって調節され，各分子はそれぞれ異なるアロステリック部位と相互作用する。アパルタミドの評価に用いた結合試験の放射性標識リガンドは“ピクロトキシン結合部位”に特異的であり（ピクロトキシンは $GABA_A$ 受容体のアンタゴニストであり痙攣誘発剤），GABA 開口性クロライドチャネルのこの部位を阻害する化合物は，動物及びヒトに痙攣を引き起こすことが報告されている [1) 2) 4)]。

痙攣はマウス及びイヌの反復投与毒性試験におけるアパルタミドの高用量群でみられており，$GABA_A$ 受容体に対する阻害作用を介するものと考えられる。ビーグル犬は痙攣への感受性が非常に高いことが知られており [3)]，イヌの 28 日間反復経口投与毒性試験においてアパルタミドの高用量群（25 mg/kg/日）の 2 週目の投与期間に，3 例の雄イヌに振戦及び痙攣がみられた【2.6.6.3.3.2 参照】。アパルタミドの血漿中 $t_{1/2}$ は 3 日間を超える長時間であり，長期間にわたり定常状態に達しなかったことが【2.6.4.3.1.3 参照】，28 日間の試験において 2 週目まで高用量群に痙攣が起こらない理由であると考えられる。イヌでみられる痙攣は C_{max} に依存すると考えられる。中枢神経系の毒性が最初に観察される時点でのアパルタミドの平均濃度は 30.2 μg/mL であり，これは 1.90 μg/mL（3.98 μmol/L）の非結合型濃度に相当する。アパルタミドの 30.2 μg/mL は外国人 CRPC 患者に 240 mg/日を投与したときの定常状態での平均 C_{max} の約 5 倍の濃度である。曝露

量をイヌとヒトのタンパク結合率で補正したときに，イヌで痙攣がみられたときのアパルタミドの非結合型濃度は，外国人 CRPC 患者に 240 mg/日を投与したときの定常状態での非結合型濃度の C_{max} の約 8 倍であった（表 2.6.2-5）。痙攣がみられた 3 例のイヌで代謝物 M3 の濃度は測定しなかったが，定常状態での代謝物と親化合物の比は，5 及び 10 mg/kg/日投与群での投与 28 日目の血漿中濃度に基づくと 59.9～77.6%の間であった【2.6.4.3.1.3 参照】。

表 2.6.2-5 イヌ及び臨床曝露量に基づく痙攣誘発性の統合解析

Study	Dose	Total C_{max} (μg/mL)	Unbound C_{max} (μg/mL)[a]
28-Day Male Dog Study	25 mg/kg/day	30.2[b]	1.90
Phase 1b QT/QTc Study 56021927PCR1019	240 mg/kg/day	5.95[c]	0.250
Dog-to-Human Exposure Ratio	-	5	8

[a] Mean unbound fraction of apalutamide is 4.2% and 6.3% in human and dog plasma, respectively【4.2.2.3.3】
[b] Average apalutamide concentration at the time of first observation of CNS toxicity【4.2.3.2.8】
[c] Mean steady state apalutamide C_{max} in men with CRPC treated with apalutamide at 240 mg/day（表 2.6.2-4）

痙攣の次に，雌雄イヌの 20 mg/kg/日以上の反復投与で認められた CNS 関連の一般状態の変化は振戦，歩行異常，運動失調等であった。雌イヌの 21 日間反復経口投与毒性試験において，20 mg/kg/日の投与後に運動失調及び振戦がみられた 1 例の雌イヌにおける，安楽死させた日（この日は未投与）のアパルタミド及び代謝物 M3 濃度はそれぞれ 35.3 及び 19.8 μg/mL であった【2.6.6.3.4.1 参照】。雄イヌの 13 及び 39 週間反復経口投与毒性試験並びに雌イヌの 13 週間反復経口投与毒性試験において，CNS への影響はみられなかった【2.6.6.3.3 及び 2.6.6.3.4.2 参照】。13 週間の雄イヌの試験において，10 mg/kg/日投与群の 91 日目のアパルタミドの C_{max} は 19.6 μg/mL，代謝物 M3 の C_{max} は 8.93 μg/mL であり【2.6.4.3.1.3 (2)参照】，いずれも臨床での曝露量を上回っていた。振戦，痙攣及び活動性低下は，雌及び雄マウスの予備的毒性試験でも認められた。痙攣がみられた 10 日間反復経口投与試験【4.2.3.4.2.2】での 175 mg/kg 投与におけるアパルタミドの平均 C_{max}（雌雄を合わせた数値）は単回投与で 50.5 μg/mL，反復投与で 31.1 μg/mL であり，外国人 CRPC 患者に 240 mg/日を投与したときの定常状態での平均 C_{max} のそれぞれ約 8 及び 5 倍であった。同様に代謝物 M3 の平均 C_{max}（雌雄を合わせた数値）は単回投与で 16.3 μg/mL，反復投与で 18.0 μg/mL であり，いずれも外国人 CRPC 患者における定常状態での代謝物 M3 の C_{max} の少なくとも 2 倍であった。マウス血漿におけるアパルタミド及び代謝物 M3 の非結合型分率はヒト血漿の約 2 倍高いため【2.6.4.4.2.1 参照】，非結合型濃度に基づく曝露量比は 2 倍よりもやや高いと考えられる。

雄ラット 28 日間反復経口投与毒性試験において，最高 150 mg/kg/日までの用量群で投与最終週に実施した FOB 検査において，アパルタミド投与に関連した CNS への影響はみられなかった。評価実施時期と同じ最終週に測定した 150 mg/kg/日投与群での定常状態（投与 28 日目）でのアパルタミドの C_{max} は 31.5 μg/mL であった。ラットの死亡がみられた，より高用量である 250 mg/kg/日におけるアパルタミドの投与 1 日目の C_{max} は 41.7 μg/mL であった。250 mg/kg/日の用量では，痙攣のような CNS への影響はみられていないが，夜間に死亡した動物では観察を実施していなかったため，死亡につながった CNS への影響を検出できなかった可能性は否定できない（2.6.2.4.1 参照）。

結論として，アパルタミド及び代謝物 M3 の $GABA_A$ 阻害作用が，マウス及びイヌ毒性試験の高用量群でみられた痙攣の作用機序であると考えられる。

2.6.2.6.2.3 心血管系及び呼吸系に関する評価

hERG 試験において，アパルタミド及び代謝物 M3 は，実測濃度でそれぞれ 6.17 及び 4.56 µmol/L の IC_{50} で hERG チャネルを阻害した（2.6.2.4.2.1(1)参照）。これら濃度は，外国人 CRPC 患者にアパルタミド 240 mg/日を投与したときの非結合型の曝露量（C_{max}）と比べて，ともに少なくとも 7 倍高かった（表 2.6.2-6）。

表 2.6.2-6 アパルタミド及び代謝物 M3 の非結合型臨床曝露量及び hERG 阻害濃度の比較

	hERG IC_{50} (µmol/L)	Clinical Total C_{max} (µg/mL)[a]	Clinical Unbound C_{max} (µg/mL)[b]	Clinical Unbound C_{max} (µmol/L)[c]	Exposure Ratio[d]
Apalutamide	6.17	5.95	0.250	0.52	12
JNJ-56142060 (M3)	4.56	5.85	0.298	0.64	7

[a] Mean steady-state apalutamide and JNJ-56142060 (M3) C_{max} in men with CRPC treated with apalutamide at 240 mg/day (表 2.6.2-4)
[b] Mean unbound fraction of apalutamide and M3 is 4.2% and 5.1%, respectively, in human plasma【4.2.2.3.3】
[c] Molecular weight for apalutamide and M3 is 477.44 and is 463.41 Dalton, respectively
[d] Exposure ratio = hERG IC_{50} (µmol/L) divided by clinical unbound C_{max} (µmol/L)

アパルタミド及び主要代謝物 M3 は最高 30 µmol/L の濃度まで，摘出イヌプルキンエ線維において活動電位の再分極を延長しなかった（2.6.2.4.2.1(2)参照）。30 µmol/L の濃度は，外国人 CRPC 患者に 240 mg/日を投与したときのアパルタミド及び代謝物 M3 の非結合型の曝露量（C_{max}）に比べて約 50 倍高かった。

アパルタミドを雌雄の覚醒イヌに投与したときに，40 mg/kg まで心血管系及び ECG パラメータに有害な影響を及ぼさなかった（2.6.2.4.2.2(1)参照）。アパルタミド 40 mg/kg 投与時の平均 C_{5h} は雄イヌで 10.2 µg/mL，雌イヌで 7.19 µg/mL であり，臨床推奨用量での曝露量（外国人 CRPC 患者）を上回っていた。また，投与 5 及び 25 時間後の代謝物 M3 の曝露量は雄イヌでそれぞれ 0.512 及び 2.12 µg/mL，雌イヌでそれぞれ 0.565 及び 1.73 µg/mL であった。曝露量をイヌとヒトのタンパク結合率で補正すると，投与 25 時間後の代謝物 M3 の非結合型濃度は，外国人 CRPC 患者に 240 mg/日を投与したときの代謝物 M3 の定常状態での非結合型 C_{max} の約 1/2 であった。

雄イヌの 28 日間，13 及び 39 週間反復経口投与毒性試験，並びに雌イヌの 13 週間反復経口投与毒性試験において，アパルタミドの最高 10 mg/kg/日までの投与により ECG パラメータに対してアパルタミド投与に関連した影響はみられなかった。雄イヌの 13 週間反復経口投与毒性試験において 10 mg/kg/日投与群の投与 91 日目での C_{max} は，アパルタミドで 19.6 µg/mL，代謝物 M3 で 8.93 µg/mL であり，いずれも臨床推奨用量での曝露量を上回っていた。

ラットの呼吸系に関する安全性薬理試験では，アパルタミド又は代謝物 M3 の最高 100 mg/kg までの単回投与で，投与に関連した影響はみられなかった。雄ラットの 13 週間反復経口投与毒性試験の投与 1 日目での TK データに基づくと，アパルタミド 100 mg/kg 投与時の C_{max} は 15.5 µg/mL であり，臨床推奨用量での曝露量を上回っていた。

結論として，安全性薬理試験及び毒性試験の結果から，臨床推奨用量である 240 mg/日での曝露量により心血管系及び呼吸系にアパルタミドの投与に関連した影響が生じる可能性は低いと考えられる。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1） Joy RM, Stark LG, Peterson SL, Bowyer JF, Albertson TE. The kindled seizure: production of and modification by dieldrin in rats. Neurobehav Toxicol. 1980;2:117-24.

2） Mohamed F, Senarathna L, Percy A, Abeyewardene M, Eaglesham G, Cheng R, et al. Acute human self-poisoning with the *N*-phenylpyrazole insecticide fipronil -A $GABA_A$-gated chloride channel blocker. J Toxicol Clin Toxicol. 2004;42:955-63.

3） Redman HC, Weir JE. Detection of naturally occurring neurologic disorders of beagle dogs by electroencephalography. Am J Vet Res. 1969;30:2075-82.

4） Suñol C, Tusell JM, Gelpí E, Rodríguez-Farré E. GABAergic modulation of lindane (γ-hexachlorocyclohexane)-induced seizures. Toxicol Appl Pharmacol. 1989;100:1-8.

5） Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. Science. 2009;324:787-90.

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: JNJ-56021927

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation)	GLP	Test Facility	Study No./ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Pharmacology of apalutamide	LNCaP/AR(cs), nuclear HRs, VCaP, LNCaP with AR-EYFP, LNCaP/AR-Luc and VP16-AR-Luc reporter cell lines	*In vitro*	N	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Clegg NJ et al., 2012 4.2.1.1.1
Anti-tumor efficacy	LNCaP/AR-luc, LNCaP/AR(cs) mouse xenografts	Oral (Caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides NF (10%), lactic acid (10%), soybean oil (10%) of 50 mM phosphate buffer	N	Memorial Sloan Kettering Cancer Center	Clegg NJ et al., 2012 4.2.1.1.1
Anti-tumor efficacy	LNCaP/AR(cs) mouse xenografts	Oral (18% PEG 400, 1% Tween 80, 1% Povidone, 15% TPGS; 65% of a 0.5% CMC solution 20mM Citrate Buffer (pH 4.0))	N	Aragon Pharmaceuticals, US-CA	DR-[redacted]-001-PHARM/ 4.2.1.1.2
Anti-tumor efficacy	LNCaP/AR(cs) mouse xenografts	Oral (18% PEG 400, 1% Tween 80, 1% Povidone, 15% TPGS; 65% of a 0.5% CMC solution 20mM Citrate Buffer (pH 4.0))	N	Aragon Pharmaceuticals, US-CA	DR-[redacted]-002-PHARM/ 4.2.1.1.3
Anti-tumor efficacy	LNCaP/AR(cs) mouse xenografts	Oral (18% PEG 400, 1% Tween 80, 1% Povidone, 15% TPGS; 65% of a 0.5% CMC solution 20mM Citrate Buffer (pH 4.0))	N	Aragon Pharmaceuticals, US-CA	DR-[redacted]-004-PHARM/ 4.2.1.1.4
Pharmacology of metabolites JNJ-56142047 (M2), JNJ-56142060 (M3) and JNJ-56142021 (M4)	LNCaP/AR-Luc and VP16-AR-Luc reporter cell lines	*In vitro*	N	Aragon Pharmaceuticals, US-CA	DR-[redacted]-003-PHARM/ 4.2.1.1.5
Pharmacology of metabolite M1	Dog plasma incubation, VP16-AR-Luc reporter cell line	*In vitro*	N	Aragon Pharmaceuticals, US-CA	DR-[redacted]-004-DSD/ 4.2.1.1.6

(Continued)

2.6.3.1　薬理試験（続き）

Test Article: JNJ-56021927

Type of Study	Test System	Route (Vehicle/Formulation)	GLP	Test Facility	Study No./ Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
Binding assays with JNJ-56021927-ZAH	55 receptors/ion channels/transporters	*In vitro*	N	[redacted], France	17201/ 4.2.1.2.1
GABA-gated receptor Binding assay with JNJ-56021927-ZAH: IC_{50} determination	GABA-gated receptor	*In vitro*	N	[redacted], France	17466/ 4.2.1.2.2
Guinea Pig Ileum Functional Bioassay with JNJ-56021927-AAA: IC_{50} determination	$GABA_A$ receptor in guinea pig ileum	*In vitro*	N	[redacted], France	18586-1/ 4.2.1.2.3
GABA-gated receptor Binding assay with metabolite M1	GABA-gated receptor	*In vitro*	N	[redacted], France	DR-[redacted]-004-DSD/ 4.2.1.2.4
GABA-gated receptor Binding assay with metabolites JNJ-56142047 (M2), JNJ-56142060 (M3) and JNJ-56142021 (M4): IC_{50} determination	GABA-gated receptor	*In vitro*	N	[redacted], France	801603/ 4.2.1.2.5
Evaluation of JNJ-56021927-AAA and enzalutamide in PTZ Infusion Seizure Model in Mice	ICR mouse (M)	Orally (gavage)	N	[redacted], US-PA	DR-[redacted]-001-DSD/ 4.2.1.2.6
Safety Pharmacology					
Central Nervous System (FOB in 28-day study): JNJ-56021927-ZAH	S-D rat (M)	Orally (gavage)	Y	[redacted], US-OH	VUM00004/ 4.2.1.3.1
Cardiovascular System: JNJ-56021927-AAA and JNJ-56142060 (M3)	CHO-K1/hERG cells	*In vitro* (DMSO in Tyrode's solution; 0.3%, v/v)	Y	[redacted], UK	TOX10776/ 4.2.1.3.2
Cardiovascular System: JNJ-56021927-AAA and JNJ-56142060 (M3)	Isolated canine cardiac Purkinje fibers	*In vitro*	Y	[redacted], US-OH	110513.BSC/ 4.2.1.3.3
Cardiovascular System: JNJ-56021927-ZAH	Beagle dog (M&F)	Orally (capsule)	Y	[redacted], UK	TOX10811/ 4.2.1.3.4
Respiratory System; JNJ-56021927-ZAH and JNJ-56142060 (M3)	S-D rat (M)	Orally (gavage)	Y	[redacted], Canada	694182/ 4.2.1.3.5

AR =androgen receptor(s); AR-EYFP =AR tagged with enhanced yellow fluorescent protein; CHO = Chinese Hamster Ovary; CMC = carboxymethyl cellulose; [redacted] Laboratories; DMSO = dimethyl sulfoxide; F = female; FOB = functional observational battery; GABA = gamma-aminobutyric acid; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = human ether-à-go-go-related gene; HR; hormone receptor; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; JNJ-56021927-AAA = the free base of apalutamide; JNJ-56021927-ZAH = the ethanolate of apalutamide; LNCaP = lymph node-derived carcinoma of the prostate; LNCaP/AR(cs) = LNCaP cells transfected with androgen receptor (codon switch); LNCaP/AR-Luc = LNCaP/AR cells with integrated androgen receptor-driven luciferase reporter construct; M = male; PEG = polyethylene glycol; PTZ = pentylenetetrazole; S-D = Sprague-Dawley; TPGS = D-α-tocopherol polyethylene glycol succinate; VCaP = vertebra-derived carcinoma of the prostate; VP16 = virion protein 16

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

概要文中に記載

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article: JNJ-56021927

Organ Systems Evaluated	Test System	Route	Concentrations or Doses	Noteworthy Findings	GLP	Study No./ Location in CTD
Binding assays	55 receptors, ion channels or transporters	*In vitro*	JNJ-56021927-ZAH: 10 μM	Inhibition of $GABA_A$-ligand interaction by 67%	N	17201/ 4.2.1.2.1
GABA-gated receptor Binding assay: IC_{50} determination	GABA-gated receptor	*In vitro*	JNJ-56021927-ZAH: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM	IC_{50} value = 3.0 μM	N	17466/ 4.2.1.2.2
Guinea Pig Ileum Functional Bioassay: IC_{50} determination	$GABA_A$ receptor in guinea pig ileum	*In vitro*	JNJ-56021927-AAA: 0.3, 1, 3, 10, and 30 μM	IC_{50} value = 0.88 μM	N	18586_1/ 4.2.1.2.3
GABA-gated receptor Binding assay	GABA-gated receptor	*In vitro*	M1: 10 μM (single concentration)	IC_{50} value > 10 μM (10% inhibition at 10 μM)	N	DR-[redacted]-004-DSD/ 4.2.1.2.4
GABA-gated receptor Binding assay: IC_{50} determination	GABA-gated receptor	*In vitro*	JNJ-56142047 (M2): 1, 3, 10, 30 and 100 μM JNJ-56142060 (M3): 1, 3, 10, 30 and 100 μM JNJ-56142021 (M4): 1, 3, 10, 30 and 100 μM	IC_{50} value = 19 μM IC_{50} value = 3.2 μM IC_{50} value = 25 μM	N	801603/ 4.2.1.2.5
Evaluation of JNJ-56021927-AAA and enzalutamide in PTZ Infusion Seizure Model	Mouse, ICR (M)	Orally (gavage) [a]	JNJ-56021927-AAA: 10, 30, 100, and 300 mg/kg Enzalutamide (MDV3100): 10, 30, 100, and 300 mg/kg	Experiment ARA030410R2 (n = 8/group): Enzalutamide produced a statistically significant decrease in the PTZ-induced seizure threshold at 100 mg/kg Experiment ARA071510R1 (n = 12/group): Enzalutamide produced a significant decrease in the seizure threshold at ≥100 mg/kg. Apalutamide did not decrease the seizure threshold at any dose tested Experiment AR091010R1 (n = 12/group): Enzalutamide did not decrease the seizure threshold at any dose tested. Apalutamide produced a statistically significant decrease in seizure threshold at 300 mg/kg Conclusion: no definitive conclusion due to variability of the vehicle response and disparate results with enzalutamide	N	DR-[redacted]-001-DSD/ 4.2.1.2.6

[a] For experiments ARA030410R2 and ARA071510R1, apalutamide (ARA071510R1 only) and enzalutamide were formulated in an aqueous suspension (Vehicle No.1) consisting of 18% PEG-400, 1% Tween-80, 1% PVP k28-32, 15% Vitamin E TPGS in 20 mM Citrate Buffer containing 0.5% CMC (pH 3). For experiments AR091010R1, apalutamide and enzalutamide were formulated in an aqueous suspension (Vehicle No.2) consisting of 31.5% PEG-400, 1.75% Tween-80, 1.75% PVP k28-32, 15% Vitamin E TPGS in 20 mM Citrate Buffer containing 0.5% CMC (pH 3)

CMC = carboxymethyl cellulose; GABA = gamma-aminobutyric acid; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; JNJ-56021927-AAA = the free base of apalutamide; M = male; PEG = polyethylene glycol; PTZ = pentylenetetrazole; PVP = polyvinylpyrrolidone; TPGS = D-α-tocopherol polyethylene glycol succinate

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: JNJ-56021927

Organ Systems Evaluated	Species/Strain Sex/No. Per Group	Route [a]	Concentrations or Doses	Noteworthy Findings	GLP	Study No./ Location in CTD
Central Nervous System (FOB in 28-day study)	S-D rat (M) (10 to 15 rats/group)	Orally (gavage)	JNJ-56021927-ZAH: 0, 50, 150, 250 mg/kg/day	Mortality at 150 and 250 mg/kg/day. Dosing at 250 mg/kg/day was terminated on Day 4. No test article-related changes during the course of the FOB assessment up to 150 mg/kg/day.	Y	VUM00004/ 4.2.1.3.1
Cardiovascular System	CHO-K1/ hERG cells	*In vitro* (DMSO in Tyrode's solution; 0.3%, v/v)	JNJ-56021927-AAA: 0, 1, 3, 10 and 30 µM (nominal concentrations) JNJ-56142060 (M3): 0, 1, 3, 10 and 30 µM (nominal concentrations)	No effect concentration = 0.407 µM hERG IC_{50} value = 6.17 µM (based on achieved concentration) hERG IC_{50} value = 4.56 µM (based on achieved concentration)	Y	TOX10776/ 4.2.1.3.2
Cardiovascular System	Isolated canine cardiac Purkinje fibers	*In vitro*	JNJ-56021927-AAA: 0, 3, 10 and 30 µM JNJ-56142060 (M3): 0, 3, 10 and 30 µM	No significant changes in APD_{60}, APD_{90}, RMP and V_{max} up to 30 µM. Statistically significant reduction in APA at 3 and 10 µM, but not at 30 µM; considered not biologically relevant No significant changes in APD_{60}, APD_{90}, APA, RMP and V_{max} up to 30 µM.	Y	110513.BSC/ 4.2.1.3.3
Cardiovascular System (telemetry study)	Beagle dog (M&F) (3 dogs/sex)	Orally (capsule)	JNJ-56021927-ZAH: 0, 10, 20 and 40 mg/kg	No treatment-related effects on blood pressure (systolic, diastolic and mean), heart rate, body temperature, ECG lead II intervals PR, QRS, QT, QT corrected for heart rate (QTcR, QTcB, QTcF and QTcV) or ECG waveform morphology up to 40 mg/kg	Y	TOX10811/ 4.2.1.3.4
Respiratory System	S-D rat (M) (6 rats/group)	Orally (gavage)	JNJ-56021927-ZAH: 0, 25, 50, 100 mg/kg JNJ-56142060 (M3): 0, 25, 50, 100 mg/kg	Slight decreases in respiratory rate at 8 and 12 hours postdose with an increase in tidal volume at 25 mg/kg; considered not biologically relevant Slight decreases in respiratory rate at 8 and 12 hours postdose with an increase in tidal volume at 25 and 100 mg/kg; considered not biologically relevant	Y	694182/ 4.2.1.3.5

[a]A lipid-based emulsion formulation was used as the vehicle in the *in vivo* studies and consisted of Acconon MC8-2 EP/NF: Capmul MCM EP: PEG-400 USP: Vitamin E TPGS NF (10:45:30:15% w/w)

APA = action potential amplitude; APD_{60} or $_{90}$ = action potential duration at 60% or 90% repolarization; CHO = Chinese Hamster Ovary; DMSO = dimethyl sulfoxide; ECG = electrocardiography; F = female; FOB = functional observational battery; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; M = male; PEG = polyethylene glycol; RMP = resting membrane potential; S-D = Sprague-Dawley; TPGS = D-α-tocopherol polyethylene glycol succinate; V_{max} = maximum rate of depolarization

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし