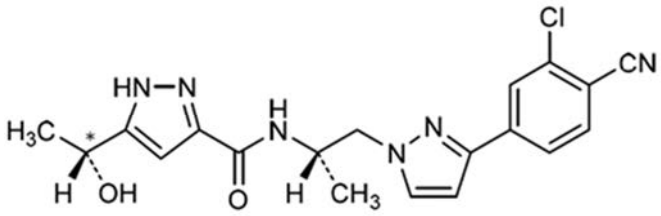
2.6.1 緒言

ダロルタミド（BAY 1841788）は、強力かつ選択的な新規のアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達阻害薬である。AR はアンドロゲン依存的なシグナル伝達を介して前立腺癌の増殖に重要な役割を果たしており、ダロルタミドは、アンドロゲンと AR との結合を阻害することにより、前立腺癌の増殖を抑制することが期待される。

ダロルタミドは、物理化学的特性（表 2.6.1- 1）及び薬理活性（2.6.2 及び 2.6.3）がいずれも同様の 2 種のジアステレオマー、(*S*,*R*)-ダロルタミド（以下、SR 体）及び(*S*,*S*)-ダロルタミド（以下、SS 体）の等量混合物である。また、ヒト及び動物の血漿中で唯一の主要な代謝物ケト-ダロルタミド（以下、M-1）はダロルタミド（SR 体及び SS 体）と同様の薬理活性を有する。生体試料の分析では、多くの場合 SR 体と SS 体を分別定量したが、両者の和も便宜上ダロルタミドと表記した。

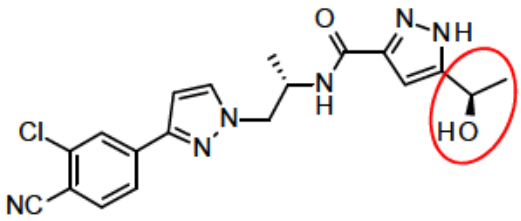
理化学的性状に関する情報、申請効能・効果及び用法・用量を以下に記載する。

構造式	 及び C*位エピマー (S,S)-ダロルタミド及び(S,R)-ダロルタミドの 2 種のジアステレオマーの等量混合物である。
医薬品一般的名称（JAN）	ダロルタミド
化学名	*N*-{(2*S*)-1-[3-(3-chloro-4-cyanophenyl)-1*H*-pyrazol-1-yl]propan-2-yl}-5-(1-hydroxyethyl)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide
分子式	$C_{19}H_{19}ClN_6O_2$
国際一般名（INN）	darolutamide
分子量	398.85
申請効能・効果	去勢抵抗性前立腺癌
申請用法・用量	通常、成人にはダロルタミドとして 1 回 600mg を 1 日 2 回、食後に経口投与する。

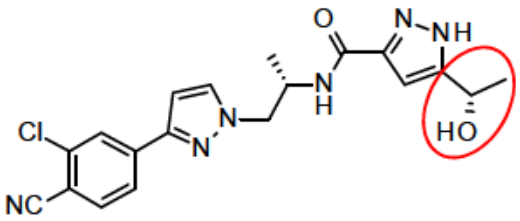
前立腺癌治療薬としての開発及び承認申請を支持する一連の非臨床試験成績は 2.6.2 以降に詳細に示す。

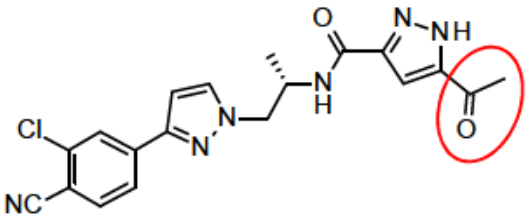
SR 体及び SS 体及び M-1 の化学構造を図 2.6.1- 1 に示す。ダロルタミドは Bayer AG 及び Orion Corporation Orion Pharma にて共同開発され、開発期間中は複数の化合物番号が使用された。化合物番号の一覧を表 2.6.1- 2 に示す。また、非臨床のモジュールで使用した略語一覧を本項末に示す。

(*S*,*R*)-darolutamide



(*S*,*S*)-darolutamide





Keto-darolutamide

図 2.6.1- 1　SR 体、SS 体及び M-1 の化学構造

表 2.6.1- 1　ダロルタミド、SR 体及び SS 体の物理化学的特性

Compound	MW	Aqueous Solubility (pH 7.4)	LogD 7.4	LogP	pKa
Darolutamide	398.85	0.02 mg/mL	2.4	2.4	11.75 ± 0.06 (acid)
(*S*,*R*)-darolutamide	398.85	[redacted] mg/mL	[redacted]	[redacted]	[redacted] ± [redacted] (acid)
(*S*,*S*)-darolutamide	398.85	[redacted] mg/mL	[redacted]	[redacted]	[redacted] ± [redacted] (acid)

Source: 4.2.2.1.8　R-12534

表 2.6.1- 2　開発中に使用した化合物番号の一覧

Name used	Bayer synonym	Orion synonym	Meaning
Darolutamide (INN)	BAY 1841788	ODM-201/ ORM-15674	1:1 mixture of 2 diastereoisomers
(*S*,*R*)-darolutamide	BAY 1896951	ORM-16497	single diast. of BAY 1841788
(*S*,*S*)-darolutamide	BAY 1896952	ORM-16555	single diast. of BAY 1841788
Keto-darolutamide	BAY 1896953	ORM-15341	ketone metabolite (M-1)
[^{13}C]darolutamide	[^{13}C]BAY 1841788	ORM-18142	stable labeled darolutamide
[^{13}C]keto-darolutamide	[^{13}C]BAY 1896953	ORM-18141	stable labeled keto-darolutamide

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
^{3}H	Tritium labeled	^{3}H 標識
^{14}C	Carbon 14 labeled	^{14}C 標識
11ß-HSD	11beta-hydroxysteroid dehydrogenase	11βヒドロキシステロイド脱水素酵素
ADH	Alcohol dehydrogenase	アルコール脱水素酵素
(α_1)AGP	Alpha 1-acid glycoprotein	α1酸性糖タンパク
A_E	Amount excreted	排泄量
AKR	Aldo-keto reductase	アルドケト還元酵素
AR	Androgen receptor	アンドロゲン受容体
AUC	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to infinity	0 時間から無限大時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC(0-24)	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to 24 hours	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC(0-t_{last})	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to last timepoint > lower limit of quantitation	0 時点から定量可能であった最終時点までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC(0-t_{last})$_{norm}$	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to last timepoint > lower limit of quantitation normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した AUC(0-t_{last})
AUC_{norm}	AUC normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した AUC
AZT	3'-azido-3'-deoxyxythymidine	3'-アジド-3'-デオキシチミジン
b.i.d./ bid	Twice daily (bis in die)	1 日 2 回
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
BCS	biopharmaceutical classification system	生物薬剤学分類システム
BDC	Bile duct-cannulation	胆管カニューレ挿入
BEI	Biliary excretion index	胆汁排泄指数
BSA	Bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン

略語	英語名称	日本語名称
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
C	Concentration	濃度
C(tx)	Concentration at time x	投与後 x 時間における濃度
CA	Chromosome Aberration	染色体異常
Caco-2 Cell	Human colon adenocarcinoma cells	ヒト結腸腺癌細胞
C_{Blood} / C_B / C_b	Concentration in blood	血液中濃度
CBR	carbonyl reductase	カルボニル還元酵素
CDCF	5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein	5(6)-カルボキシ-2',7'-ジクロロフルオレセイン
Ceq_{max}	Maximum concentration of radioactivity	最高放射能濃度
$Ceq_{max,norm}$	CEQ_{max} normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した CEQ_{max}
CL	Total clearance	全身クリアランス
C_{last}	Last concentration value above lower limit of quantitation	定量下限を上回る最終時点の濃度
CL_P	Plasma clearance	血漿クリアランス
CL_B	Blood clearance	血液クリアランス
C_{max}	Maximum drug concentration in plasma	最高血漿中薬物濃度
$C_{max, norm}$	C_{max} normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した C_{max}
$C_{max,u}$	Maximum unbound drug concentration in plasma	最高血漿中非結合型薬物濃度
C_{Plasma} / C_p	Concentration in plasma	血漿中濃度
CRPC	Castration resistant prostate cancer	去勢抵抗性前立腺癌
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
CV	Coefficient of variation	変動係数
DMSO	Dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase	ジヒドロピリミジン脱水素酵素
DRF	Dose-range finding	用量設定
EC_{50}	Half maximal effective concentration	50%有効濃度
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁

略語	英語名称	日本語名称
E_{max}	Maximum induction ratio	最大誘導比
eq	Equivalents	当量
ES	Estrone-3-sulfate	エストロン-3-硫酸
F	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
f or F	Female	女性、雌
FCS	Fetal calf serum	ウシ胎児血清
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
f_u	Fraction of free (unbound) drug in plasma	血漿中薬物の非結合型分率
GABA	Gamma-aminobutyric acid	γ-アミノ酪酸
GIT	Gastrointestinal tract	消化管
gMean	Geometric mean	幾何平均
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
gSD	Geometric standard deviation	幾何標準偏差
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HIM	Human intestinal microsomes	ヒト腸ミクロソーム
HLC	Human liver cytosol	ヒト肝サイトゾール
HLM	Human liver microsomes	ヒト肝ミクロソーム
HRM	Human renal microsomes	ヒト腎ミクロソーム
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HRMS	high resolution mass spectrometry	高分解能質量分析
HSA	Human serum albumin	ヒト血清アルブミン
i.v./ iv / IV	Intravenous(ly)	静脈内
IC_{50}	Concentration required for 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Council on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
k_a	Absorption constant	吸収速度定数
K_i	Inhibition constant	阻害定数

略語	英語名称	日本語名称
LC-HRMS	Liquid chromatography high resolution mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／高分解能質量分析
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem-mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析
LH	Luteinizing hormone	黄体形成ホルモン
LHRH	Luteinizing hormone releasing hormone	黄体形成ホルモン放出ホルモン
LLOQ	Lower limit of quantitation	定量下限
LSC	Liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
LTS	Long term stability	長期保存安定性
M	Molar	モル濃度
M	Metabolite	代謝物
M-1	Metabolite-1, keto-darolutamide	M-1、ケト-ダロルタミド
m or M	Male	男性、雄
MATE1	Multidrug and toxin extrusion 1	-
MATE2K	Multidrug and toxin extrusion 2K	-
MBq	Megabecquerel	メガベクレル
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎臓
MDR1	Multiple drug resistance 1	多剤耐性遺伝子 1
MPP^+	1-Methyl-4-phenylpyridinium ion	1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2	多剤耐性関連タンパク 2
MR	Metabolic ratio of metabolite AUC and parent drug AUC	親化合物 AUC に対する代謝物 AUC の比
MRT	Mean residence time	平均滞留時間
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐用量
n.a.	Not applicable	該当なし
n.c.	Not calculated	計算されていない
n.d.	Not determined	測定されていない
NA	Not available	該当なし
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

略語	英語名称	日本語名称
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NFA	Niflumic acid	ニフルム酸
NMR	Nuclear magnetic resonance spectrometry	核磁気共鳴分光法
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NTCP	Na+-taurocholate cotransporting polypeptide	Na+-タウロコール酸共輸送ポリペプチド
NRU	Neutral red uptake	ニュートラルレッド取り込み
nu	Nude	ヌード
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
O-DEM	p-Nitroanisole-O-Demethylase	p-ニトロアニソール-O-脱メチル化酵素
p.o./ po / PO	Per os, oral(ly)	経口
P450	Cytochrome P450	チトクローム P450
PAH	p-Aminohippuric acid	パラアミノ馬尿酸
P_{app}	Apparent permeability coefficient value	みかけの透過係数
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク
PXR	Pregnane X receptor	プレグナン X 受容体
q.d. / qd	Once daily (quaque die)	1 日 1 回
RA	Ratio of accumulation after repeated dosing	反復投与後の蓄積比
RIS	Relative induction score	-
SC	Subcutaneous(ly)	皮下投与
SD	Standard deviation	標準偏差
SE	Standard Error	標準誤差
SOP	Standard operating procedures	標準操作手順書
SPE	Solid phase extraction	固相抽出
$t_{1/2}$	Half-life	半減期

略語	英語名称	日本語名称
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{last}	Time of last concentration above LLOQ	定量下限を上回る濃度が検出された最終時点
t_{max}	Time to reach maximum drug concentration in plasma	最高血漿中薬物濃度到達時間
TTC	Threshold of Toxicological Concern	毒性学的懸念の閾値
UDPGA	Uridine diphosphoglucuronic acid	ウリジン二リン酸グルクロン酸
UGT	Uridine diphosphate Glucuronosyltransferase	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態の分布容積
WBA	Whole body autoradiography	全身オートラジオグラフィ

2.6.2 薬理試験の概要文の目次

2.6.2.1 まとめ 3
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 3
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 4
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 4
2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.2.1 *In vitro* における特性 7
2.6.2.2.1.1 ダロルタミドの生化学的及び細胞学的活性 7
2.6.2.2.1.1.1 ダロルタミドの AR 結合活性 7
2.6.2.2.1.1.2 細胞におけるダロルタミドの活性 7
2.6.2.2.1.1.3 AR 変異体に対するダロルタミドの作用 11
2.6.2.2.1.2 ダロルタミドの細胞増殖抑制作用 11
2.6.2.2.2 *In vivo* における特性 12
2.6.2.2.2.1 未成熟ラットを用いた試験 12
2.6.2.2.2.2 VCaP 細胞を用いた有効性試験及び薬物動態パラメータの検討 14
2.6.2.2.2.2.1 去勢雄マウスの VCaP 異種移植モデル 14
2.6.2.2.2.2.2 未去勢及び去勢雄マウスの VCaP 同所性異種移植モデル 17
2.6.2.2.3 PK/PD 評価 18
2.6.2.3 副次的薬理試験 20
2.6.2.3.1 特異性 20
2.6.2.3.1.1 種々の受容体及び酵素 20
2.6.2.3.1.2 プロゲステロン受容体、5-HT トランスポーター及び $GABA_A$ 受容体 20
2.6.2.4 安全性薬理試験 22
2.6.2.4.1 心血管系 22
2.6.2.4.1.1 *In vitro* 試験 22
2.6.2.4.1.1.1 hERG カリウムチャネル 22
2.6.2.4.1.1.2 L 型カルシウムチャネル 22
2.6.2.4.1.2 *In vivo* 試験 23
2.6.2.4.1.2.1 静脈内投与（麻酔イヌ） 23
2.6.2.4.1.2.2 経口投与（覚醒イヌ） 24
2.6.2.4.2 呼吸器系 25
2.6.2.4.3 中枢神経系 25

2.6.2.4.4　　胃腸管系 25
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用 27
2.6.2.6　考察及び結論 28
2.6.2.7　図表 31
引用文献一覧 32

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

ダロルタミドは、強力かつ選択的なアンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達阻害薬であり、去勢抵抗性前立腺癌の治療を目的として開発されてきた。ダロルタミドは、フレキシブルな極性基置換ピラゾール構造を有する非ステロイド系化合物で、原薬は同等の薬理活性を有する 2 種類のジアステレオマー〔(*S*,*R*)-ダロルタミド（以下、SR 体）、(*S*,*S*)-ダロルタミド（以下、SS 体）〕を 1：1 の比率で含有する混合物である。ダロルタミドの作用機序は、AR のリガンド結合ドメインにおける高親和性の競合結合である。

AR シグナル伝達は、前立腺癌の進行に関わる重要な情報伝達経路であり、アンドロゲン刺激により前立腺癌は増殖する。局所進行性及び転移性前立腺癌患者に対する標準治療として、外科的去勢又は黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）受容体作動薬を用いた内科的去勢によるアンドロゲン遮断療法（ADT）が確立されているが、去勢は性腺のテストステロン産生を遮断するものの、副腎又は腫瘍自体のテストステロン合成は抑制しない。一方、AR 拮抗作用を有する薬剤は、アンドロゲンの AR への結合を阻害し、AR のシグナル伝達を抑制することができる。

前立腺において、AR は間質細胞及び分泌上皮細胞に選択的に発現している。体循環中のテストステロンは前立腺の上皮細胞及び間質細胞に運ばれ、ジヒドロテストステロン（DHT）に変換される。テストステロン及び DHT は、いずれも AR に結合し得る。リガンドが結合していない不活性状態の AR は主に細胞質内に局在し、熱ショックタンパク質と複合体を形成している。AR のリガンド結合ドメインにアンドロゲンが結合すると、AR は構造変化を起こし、熱ショックタンパク質から解離する。解離した AR は核内へ移行し、遺伝子調節領域の特異的 DNA 配列を認識して、アンドロゲン応答遺伝子の転写を促進する又はまれに転写を抑制する。最もよく知られたアンドロゲン応答遺伝子は、精液中のセリンプロテアーゼである前立腺特異抗原（PSA）をコードする遺伝子である。AR はほぼすべてのヒト組織で発現しており、AR の機能は男性生殖器に特異的なものではない。

初回診断時の前立腺癌は、限局性病変であることが多い。患者の大多数は、局所療法のみ又は局所療法とアジュバント ADT の併用による治療を受ける。ADT 中の患者の多くが最終的に ADT に抵抗性を示すようになり、テストステロン値が去勢レベルにあるにもかかわらず血清 PSA 値の上昇を認めると定義される去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）に進行する。非転移性 CRPC（nmCRPC）は、画像所見及び臨床所見で転移が認められない前立腺癌患者において、テストステロン値が去勢レベルにあるにもかかわらず血清 PSA 値の上昇を認める状態である。ADT は非転移性前立腺癌の治療にも用いられる。nmCRPC 患者の約 30%が 2 年以内に骨転移を生じ、全生存期間（OS）の中央値は約 4 年である。転移の高リスク群は、PSA の倍加時間が短いことによって特定することができる。CRPC 患者の多くが最終的に転移性 CRPC（mCRPC）に進行する（前立腺癌の病態に関する詳細は 2.5 の緒言を参照）。

前立腺癌は AR シグナル伝達阻害によって増殖を抑制することが可能である。進行性前立腺癌の標準治療として、AR シグナル伝達阻害薬と、内科的又は外科的去勢とが併用される。LHRH 作動薬と併用してよく使用される現在使用可能な AR シグナル伝達阻害薬は、エンザルタミド、ビカルタミド、フルタミド及び nilutamide（国内未承認）等である。この中でエンザルタミド及びビカルタミドが最も広く使用されている。また最近では、国外において新規の AR シグナル伝達阻害薬アパルタミド（国内未承認）と前述のエンザルタミドが、nmCRPC の適応症で承認されている。進行性前立腺癌患者の多くが CRPC へ、そして mCRPC へと進行する。この段階では、数

種類の治療薬が利用可能である。抗がん剤であるドセタキセルが標準治療として用いられ、こうした患者の症状のコントロール及び OS の改善が図られる。近年、アビラテロン酢酸エステル、カバジタキセル、sipuleucel-T（国内未承認）及び塩化ラジウム（^{223}Ra）といった新規治療薬が、mCRPC 患者（化学療法歴なしの患者及び化学療法歴ありの患者）における OS の延長と症状のコントロールを目的として承認されている。

前述のように、ダロルタミドは強力かつ選択的な新規の AR シグナル伝達阻害薬であり、その作用機序は AR のリガンド結合ドメインにおける高親和性の競合結合である。ダロルタミドが AR の核内移行及びそれに続く転写活性を抑制し、前立腺癌細胞の増殖を阻害すること、並びにヒト前立腺癌の動物モデルにおいて抗腫瘍効果を示すことが、一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験から示された。これらの試験結果により、ダロルタミドの単剤としての前立腺癌に対する有効性が支持される。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

100 種類以上の受容体及び酵素を用いて、放射性リガンド結合試験及び酵素分析試験により、ダロルタミド、SR 体、SS 体及びヒト血漿中の主要な代謝物であるケト-ダロルタミド（以下、M-1）のオフターゲット作用を検討したところ、ヒトにダロルタミド 600mg を 1 日 2 回経口投与後において、オフターゲット作用が発現する可能性は低いと考えられる。

ダロルタミド及び M-1 は 10μM で、ヒトのプロゲステロン受容体に対し結合阻害作用を示したが、プロゲステロン受容体の IC_{50} 値はいずれもヒトの AR の IC_{50} 値に比し 78 倍以上高かった。

ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 は 5 又は 10μM で、ヒトのセロトニン（5-HT）トランスポーターに対し結合阻害作用を示し、更に、*in vitro* 機能試験により検討した結果、ダロルタミドは 5-HT の取り込みを阻害したが、その IC_{50} 値は AR の IC_{50} 値に比し 50 倍以上高かった。また、ダロルタミド及び M-1 は、*in vitro* 機能試験において、$GABA_A$ 受容体を濃度依存的に阻害したが、その IC_{50} 値はいずれも AR の IC_{50} 値に比し 80 倍以上高かった。ダロルタミド及び M-1 はいずれも、脳における組織中濃度／血漿中濃度比は低いことから、5-HT の取り込み阻害や $GABA_A$ 受容体阻害により中枢神経系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験では、ICH S7A 及び S7B ガイドラインに従い、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 が生命維持に重要な器官系〔心血管系（心電図を含む）、呼吸器系〕及び胃腸管系に及ぼす影響を検討した。試験は、各被験物質の *in vitro* 及び単回投与による *in vivo* で実施した。また、ダロルタミドの動脈圧及び心電図、並びに中枢神経系に及ぼす影響については、毒性試験において検討した。重要な試験はすべて、特記しない限り、GLP に従い実施した。試験一覧を表 2.6.2.1- 1 に示し、特記しない限り単回投与で実施した。

表 2.6.2.1- 1 ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の安全性薬理試験一覧

Test system (Cells/ Species)	Concentration/ Doses	Test Article	GLP	Report No.
hERG-mediated K^+ channel assay (human embryonic kidney cell line)	*In vitro*: 1, 3, 10 and 30 µM	darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide keto-darolutamide	No	R-9683
L-type calcium channel (human neuroblastoma cell line)	*In vitro*: 1, 3, 10, 30 and 100 µM	darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide keto-darolutamide	No	R-9689
CNS-function within the frame of the systemic 28-day toxicity study (rat/ Wistar)	Oral: 0, 100, 300, and 1000 mg/kg/day	darolutamide	Yes	R-9668
Pulmonary function, whole body plethysmography (rat/ Wistar)	Oral: 0, 100, 300, and 1000 mg/kg	darolutamide	Yes	R-9687
Gastrointestinal tract, charcoal propulsion (rat/ Wistar)	Oral: 0, 30, 100, 300, and 1000 mg/kg	darolutamide	No	R-9686 R-9688
Cardiohemodynamics and ECG (anesthetized dog/ Beagle)	Intravenous: cumulatively, 30 minutes 0, 3, 10 and 20 mg/kg for darolutamide 0, 1, 3 and 10 mg/kg for (*S*,*S*)-darolutamide	darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	Yes	R-9690/ R-12430 R-9691/ R-12429
Arterial blood pressure and ECG within the frame of systemic 28-day, 13- and 39-week toxicity studies (conscious dog/ Beagle)	Oral: 0, 50, 200 and 800 mg/kg/day or 0, 50, 150 and 400 mg/kg/day	darolutamide	Yes	R-9667 R-9672 R-9679

ダロルタミドはラットの中枢神経系及び呼吸機能に生理学的に問題となる影響を及ぼさなかった。

ダロルタミドにより、ラットの胃腸管機能パラメータに変化がみられたが（胃内容排出能及び腸管内輸送能の低下）、これらの変化はダロルタミドを溶液として投与した場合にのみ認められた。

ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 による QT 間隔延長のリスクを検討するため、*in vitro*（hERG カリウムチャネル電位固定アッセイ及び L 型カルシウムチャネル蛍光アッセイ）、並びに *in vivo*〔覚醒下（ダロルタミド）及び麻酔下（ダロルタミド及び SS 体）のイヌの心電図記録における QT/QTc 間隔（補正 QT 間隔）〕試験を実施した。高濃度でみられた hERG カリウム電流の阻害作用（ダロルタミドの外挿 IC_{50} 値：87.9µM）は生理学的に問題とはならないと考えられる。L 型カルシウムチャネルに対しても同様に高濃度でのみ阻害がみられた（ダロルタミドの IC_{50} 値：37.4µM）。麻酔イヌの心電図において、ダロルタミド又は SS 体の最高用量投与後の非結合型最高血漿中濃度（$C_{max,u}$、それぞれ 9.7 又は 5.7µM）においても、QT/QTc 間隔の延長及び QT/QTc に関連した不整脈はみられなかった。

ダロルタミド又は SS 体を麻酔イヌに静脈内投与後の心血管機能に及ぼす影響を検討したところ、いずれも $C_{max,u}$ が 2µM 以上において、動脈圧低下に伴う血管拡張の徴候、及び短時間でわずかな QT/QTc 間隔の短縮がみられた。SS 体を最高用量で投与後、4 例中 1 例で一過性の完全房室ブロックがみられた（$C_{max,u}$：5.7µM）。しかし、麻酔イヌにおけるダロルタミド及び SS 体の $C_{max,u}$ は、ヒトにダロルタミド 600mg を 1 日 2 回経口投与後のダロルタミド及び SS 体の $C_{max,u}$ を十分に上回っていた。

覚醒イヌでは、麻酔イヌでみられた心血管系に対する影響はみられなかった。すなわち、イヌの 28 日間、13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験において、ダロルタミドによる動脈圧及び心電図の明らかな変化はみられなかった。ダロルタミドの $C_{max,u}$ は、最大で 2.9μM の高濃度に達した。

2.6.2.1.4　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* における特性

In vitro において、ダロルタミドは AR に選択的かつ高親和性で結合し、ヒト AR（hAR）に対し拮抗作用を示す。ダロルタミドは薬理活性を有する 2 種類のジアステレオマー（SR 体及び SS 体）を 1：1 の比率で含有する混合物であるが、ジアステレオマー間の薬理活性に顕著な差はなかった。血中の主要代謝物 M-1 もダロルタミドと同様の薬理活性を示した。AR を人為的に過剰発現させたヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞（HS-HEK293 細胞）において、ダロルタミドは類薬であるビカルタミドとは異なる、より好ましい拮抗作用プロファイルを示した。ダロルタミドはビカルタミドと比較して、テストステロンによって誘導される AR の核内移行をより強く抑制し、また、内因性 AR 遺伝子増幅及び AR 過剰発現を有する VCaP 前立腺癌細胞において、ダロルタミドはアンドロゲン誘発性の細胞増殖を濃度依存的、かつビカルタミドと比較してより効果的に抑制した。AR の W742L 変異（742 番目のアミノ酸がトリプトファンからロイシンに変異）は、ビカルタミドに対する抵抗性をもたらす。この AR 変異に対して、ビカルタミドは純粋な作働薬として作用するが、ダロルタミド及び M-1 は拮抗作用を示し、類薬のエンザルタミド及びアパルタミドは弱い拮抗作用を示した。AR の F877L 変異（877 番目のアミノ酸がフェニルアラニンからロイシンに変異）は、エンザルタミド及びアパルタミドに対する抵抗性をもたらす。この変異に対し、エンザルタミド及びアパルタミドは拮抗作用を失い、部分作働薬として作用するが、ダロルタミド及び M-1 は拮抗作用を示した。更に、類薬フルタミドに対して抵抗性を示す AR の T878A 変異（878 番目のアミノ酸がスレオニンからアラニンに変異）に対しても、ダロルタミド及び M-1 は拮抗作用を示した。

2.6.2.2.1.1 ダロルタミドの生化学的及び細胞学的活性

2.6.2.2.1.1.1 ダロルタミドの AR 結合活性

参照項目：4.2.1.1.1 R-9750

ラット AR（rAR）に対するダロルタミドの結合親和性を、1nM [^{3}H]mibolerone〔解離定数（Kd）:0.16nM〕存在下の競合的結合試験により検討した。ダロルタミドは類薬であるビカルタミドと同程度の結合親和性を示した。ジアステレオマー（SR 体及び SS 体）、並びに M-1 も rAR に対して同様の結合親和性を示した（表 2.6.2.2- 1）。

表 2.6.2.2- 1 ダロルタミド、ジアステレオマー及び M-1 の rAR に対する K_i 値

	Compound				
	Bicalutamide	Darolutamide	(*S,R*)-darolutamide	(*S,S*)-darolutamide	Keto-darolutamide
K_i (nM)	12	9	9	19	8

Data source: R-9750

2.6.2.2.1.1.2 細胞におけるダロルタミドの活性

参照項目： 4.2.1.1.2 R-9751
4.2.1.1.3 R-9752

培養細胞を用いた試験において、ダロルタミドの作用を検討した。完全長 hAR をコードする遺伝子及びアンドロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を組込んだ発現ベクターを導入し

た HEK293 細胞（AR-HEK293 細胞）を用い、最大効果を発揮する濃度未満のテストステロン（0.45nM）存在下で、種々の濃度の被験薬の拮抗作用を検討するトランスアクチベーションアッセイを実施した（R-9751）。

その結果、ダロルタミドは AR 拮抗作用を示し、テストステロンによるレポーター遺伝子転写活性を抑制したことから、AR シグナル伝達を阻害することが確認された。また、同様の作用がジアステレオマー（SR 体及び SS 体）、並びに M-1 においても確認された（R-9751）。hAR に対するダロルタミド、ジアステレオマー（SR 体及び SS 体）、並びに M-1 の拮抗作用は、ビカルタミドよりも強かった（表 2.6.2.2- 2）。

表 2.6.2.2- 2　AR-HEK293 細胞におけるビカルタミド、並びにダロルタミド、ジアステレオマー及び M-1 の hAR に対する活性（IC_{50} 値）

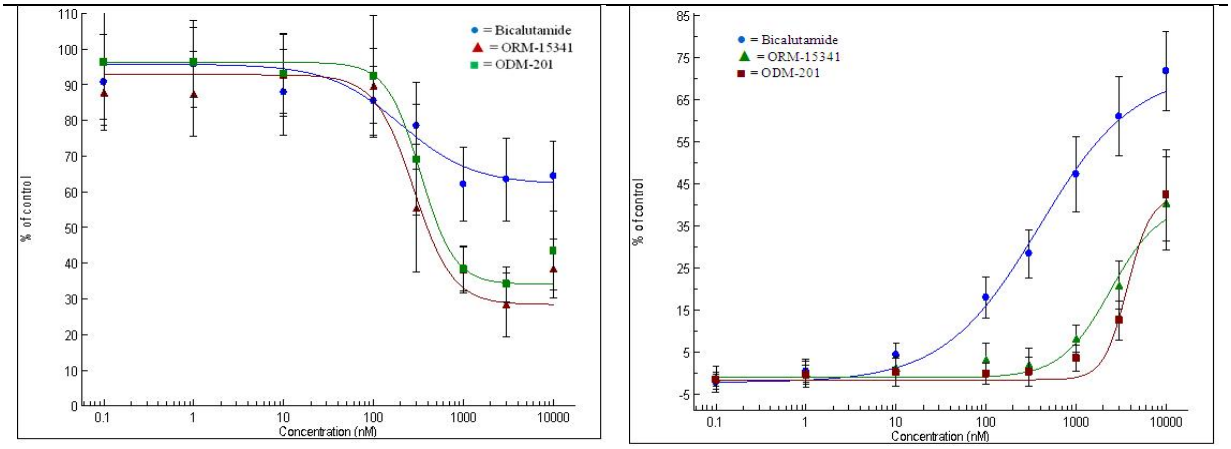
	Compound				
	Bicalutamide	Darolutamide	(*S,R*)-darolutamide	(*S,S*)-darolutamide	Keto-darolutamide (M-1)
IC_{50} (nM)	150±66 (7)	65±14 (4)	38±21 (3)	51±34 (3)	25±17 (4)

Each value is a mean±SD of 3-7 independent experiments
Number of experiments are presented in parentheses
Data source: R-9751

AR-HEK293 細胞のクローンであり AR を過剰に発現している HS-HEK293 細胞（AR の発現レベルが AR-HEK293 細胞の約 5 倍）を用いて、同様の検討を実施した。ダロルタミドは 300nM 以上の濃度で拮抗作用を示した〔テストステロンによるレポーター遺伝子転写活性（テストステロン誘発活性）を 100%とした場合、テストステロン誘発活性を 66%阻害）。これはビカルタミドの阻害パターンとは異なり、ビカルタミドは親細胞である AR-HEK293 細胞では強い拮抗作用を示すが、AR 過剰発現の HS-HEK293 細胞ではμM レベルの濃度で弱い阻害作用を示すのみであった（1μM でテストステロン誘発活性の阻害は最大 38%）（図 2.6.2.2- 1 左図）。

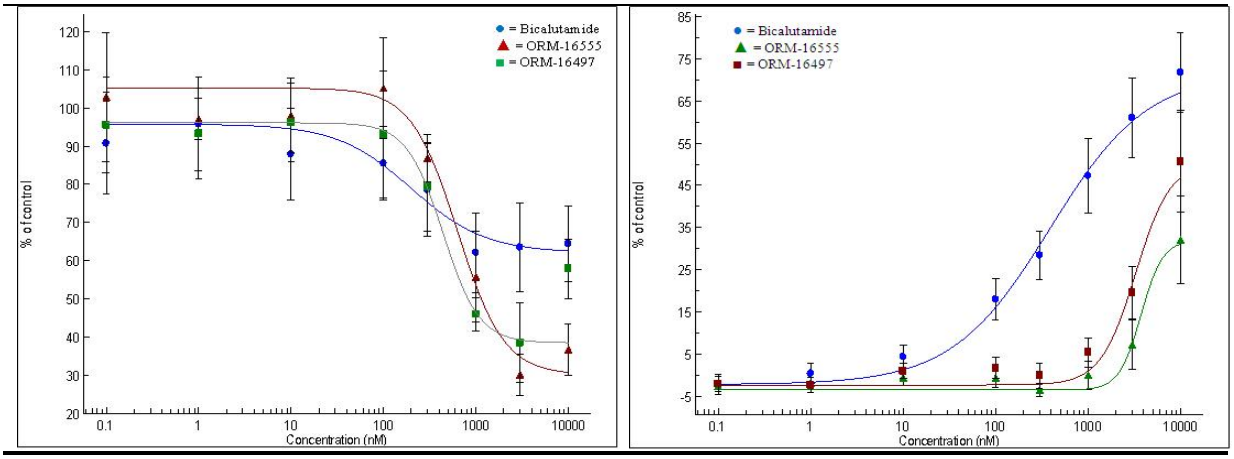
M-1 も AR 過剰発現 HS-HEK293 細胞において、ダロルタミドと同様の拮抗作用を示した（テストステロン誘発活性を 72%阻害）（図 2.6.2.2- 1 左図）。

AR 過剰発現 HS-HEK293 細胞に対し、ビカルタミドは前述のように拮抗作用が弱いことに加え、100nM 以上の濃度では作働薬として作用した（テストステロン誘発活性を 100%とした場合、ビカルタミドの誘発活性は 72%）。一方、ダロルタミドは、3μM 以上の濃度でのみ作動薬として作用した（図 2.6.2.2- 1 右図）。ダロルタミドのジアステレオマー（SR 体及び SS 体）は、いずれも AR 過剰発現 HS-HEK293 細胞において明らかな拮抗作用及び弱い作動薬作用を示した。SS 体は SR 体よりもわずかに強い拮抗作用を有していた（図 2.6.2.2- 2）。



% of control = androgen-induced reporter gene activity when expressed relative to 100% stimulation obtained with testosterone.
Each value is a mean of at least 4 independent experiments and 3 parallels.
ODM-201: Darolutamide, ORM-15341: keto-darolutamide (M-1)
Data source: R-9751

図 2.6.2.2- 1　　AR 過剰発現細胞 HS-HEK293 におけるビカルタミド、ダロルタミド及び M-1 の作用



% of control = androgen-induced reporter gene activity when expressed relative to 100% stimulation obtained with testosterone.
Each value is a mean of at least 4 independent experiments and 3 parallels.
ORM-16497: (*S,R*) diastereomer, ORM-16555: (*S,S*) diastereomer
Data source: R-9751

図 2.6.2.2- 2　　AR 過剰発現細胞 HS-HEK293 におけるビカルタミド及びダロルタミドのジアステレオマーの作用

ビカルタミドに比しダロルタミドの拮抗作用が強力であることが、AR の細胞内局在性への影響によって説明され得るかどうかを検討するために、AR 過剰発現 HS-HEK293 細胞において AR の細胞内局在性に対するダロルタミド及び被験薬の影響を AR の免疫標識により評価した（R-9752）。アンドロゲン非存在下では AR の大部分は細胞質に局在するが、テストステロン 0.6nM（最大濃度）存在下では AR の核内局在比（AR 免疫蛍光の核／細胞質比）が上昇したことから、アンドロゲンにより AR が細胞質から核内へ移行することが示された。ビカルタミドは 0.2μM 以上の濃度で、AR の核内局在比を上昇（テストステロン誘発時の AR 核内局在比上昇の 50%以上）

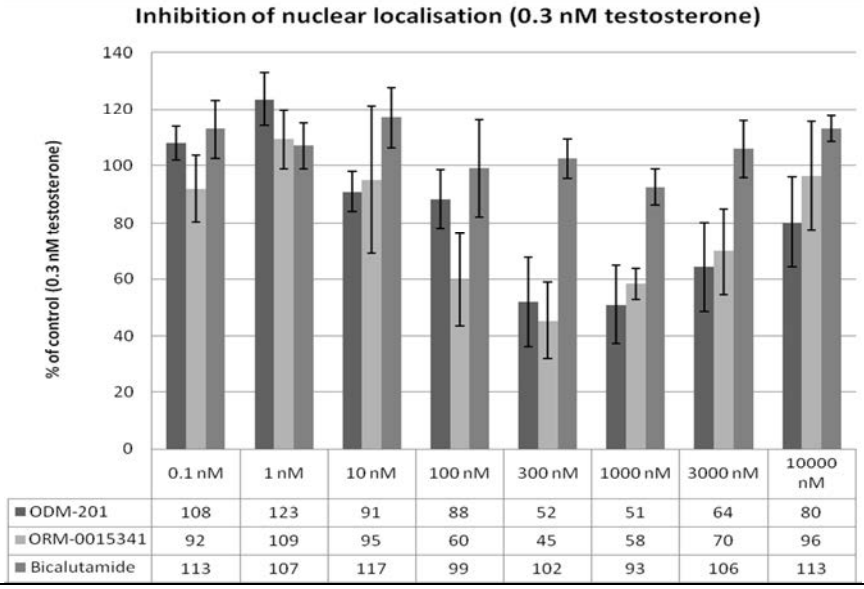
させ、ダロルタミド及び M-1 は、それぞれ 5μM 以上及び 1μM 以上で、AR の核内局在比を上昇させた（表 2.6.2.2- 3）。したがって、ビカルタミドによる AR の核内移行性は、ダロルタミドの約 25 倍、M-1 の約 5 倍強く、ダロルタミド及び M-1 存在下では、全濃度域で同濃度のビカルタミドよりも AR が細胞質内に多く保持された（4.2.1.1.3 R-9752　Figure 1）。また、0.3nM テストステロンで誘発した AR の核内移行に対し、ダロルタミド及び M-1 は、100～300nM 以上の濃度で核内移行を抑制したが、ビカルタミドは、いずれの濃度においてもテストステロン誘発による AR の核内移行を抑制しなかった（図 2.6.2.2- 3）（R-9752）。

以上の結果は、前述のトランスアクチベーションアッセイの結果とよく一致しており、ビカルタミドとダロルタミドの作用プロファイルの違いが、AR の核内移行性への作用の違いにより説明され得る可能性がある。

表 2.6.2.2- 3　AR 過剰発現細胞 HS-HEK293 におけるビカルタミド、ダロルタミド及び M-1 による AR の核内移行

Compound	Concentration inducing ≥50% of control-induced (0.6 nM testosterone) nuclear vs. cytoplasmic ratio	Stimulation (%) at 3 µM
Bicalutamide	≥0.2 µM	70
Darolutamide	≥5 µM	40
Keto-darolutamide (M-1)	≥1 µM	50

Each value is a mean of at least 2 independent experiments and 3 parallels (n = 6)
Data source: R-9752



% of control (0.3 nM testosterone) indicates test compound-induced nuclear vs. cytoplasmic ratio of AR immunofluorescence relative to testosterone-induced nuclear vs. cytoplasmic ratio (100%).
Each value is a mean of at least 2 independent experiments and 3 parallels (n = 6). Error bars indicate standard deviation.
ODM-201: Darolutamide, ORM-0015341: Keto-darolutamide (M-1)
Data source: R-9752

図 2.6.2.2- 3　AR 過剰発現細胞 HS-HEK293 におけるビカルタミド、ダロルタミド及び M-1 による AR の核内移行の阻害

2.6.2.2.1.1.3 AR 変異体に対するダロルタミドの作用

参照項目： 4.2.1.1.4 R-9753
4.2.1.1.5 R-9754
4.2.1.1.11 Scientific Reports 2015_5_12007

AR 変異体である T878A、F877L 及び W742L（新命名法 NP_000035.2 に基づく。以前の変異型名 T877A、F876L 及び W741L に相当）に対する被験薬（ダロルタミド、M-1、ビカルタミド、エンザルタミド、アパルタミド）の作用について、個々の変異型 AR をコードする遺伝子及びアンドロゲン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を組込んだ発現ベクターを導入したヒト骨肉腫細胞株 U2-OS を用いたトランスアクチベーションアッセイにより検討した（R-9753、R-9754 及び Scientific Reports 2015_5_12007）。

W742L 変異型 AR に対して、ビカルタミドは作働薬として作用し、ダロルタミド及び M-1 は拮抗作用を示した（IC_{50} 値は、それぞれ 1.1～1.5μM 及び 1.1～1.2μM）。エンザルタミド及びアパルタミドは弱い拮抗作用を示した。F877L 変異型 AR は、エンザルタミド及びアパルタミドの拮抗作用を消失させる。エンザルタミド及びアパルタミドはこの変異に対し部分作動薬として作用したが、ダロルタミド及び M-1 はいずれも拮抗作用を示し、F877L 変異型 AR のテストステロン誘発活性を抑制した（IC_{50} 値は、それぞれ 0.07～0.085μM 及び 0.047～0.05μM）。T878A 変異型 AR に対してもダロルタミド及び M-1 は拮抗作用を示した（IC_{50} 値は、それぞれ 1.8～2.6μM 及び 0.7～1.4μM）（表 2.6.2.2- 4）。

表 2.6.2.2- 4 U2-OS 細胞における変異型 AR に対するビカルタミド、ダロルタミド、M-1、エンザルタミド及びアパルタミドの作用

Compound	AR W742L IC_{50} (μM)	AR F877L IC_{50} (μM)	AR T878A IC_{50} (μM)
Bicalutamide	agonist (3)[a,](4)[b]	n.d.	0.8±0.2 (4)[b]
Darolutamide	1.5 [0.8-2.7] (3)[a]	0.07 [0.06-0.08] (3)[a]	1.8 [1.2-2.6] (3)[a]
	1.1±0.1 (4)[b]	0.085±0.012 (3)[c]	2.6±0.9 (4)[b]
Keto-darolutamide (M-1)	1.2 [0.8-1.8] (3)[a]	0.05 [0.05-0.06] (3)[a]	0.7 [0.3-1.4] (3)[a]
	1.1±0.1 (4)[b]	0.047±0.015 (3)[c]	1.4±0.6 (4)[b]
Enzalutamide	>10 (3)[a]	agonist (3)[a,c]	0.3 [0.2-0.4] (3)[a]
Apalutamide	>10 (3)[a]	agonist (3)[a,c]	1.1 [0.8-1.7] (3)[a]

Each value is a mean of 3-4 independent experiments or IC_{50} [95%CI] estimated from regression curve of triplicates data
Number of experiments are presented in parentheses
Data source: [a] Scientific Reports 2015_5_12007, [b] R-9753, [c] R-9754

2.6.2.2.1.2 ダロルタミドの細胞増殖抑制作用

参照項目：4.2.1.1.6 R-9755
4.2.1.1.11 Scientific Reports 2015_5_12007

ダロルタミド、M-1 及びビカルタミドの前立腺癌細胞に対する増殖抑制作用について、アンドロゲン感受性 VCaP 細胞株の増殖抑制を指標として検討した。VCaP 細胞は内因性 AR 遺伝子増幅及び AR 過剰発現などの臨床的な前立腺癌の特性を有している。ダロルタミド及び M-1 はアンドロゲン誘発性の VCaP 細胞増殖を濃度依存的に抑制した（合成アンドロゲンであるミボレロンによる細胞増殖を 100％とした）。一方、ビカルタミドは部分的に増殖を抑制したのみであった（65％抑制）（R-9755）。IC_{50} 値は、ビカルタミドで 1.2μM、ダロルタミド及び M-1 でそれぞれ 0.5μM 及び 0.65μM であった（表 2.6.2.2- 5）。これらの結果は、ダロルタミド及び M-1 が AR を過剰発現している前立腺癌細胞の増殖を効果的に抑制できることを示唆している。

別の試験（Scientific Reports 2015_5_12007）においても同様の結果であり、IC_{50} 値はダロルタミド及び M-1 で、それぞれ 0.23μM 及び 0.17μM、エンザルタミド及びアパルタミドで、それぞれ 0.41μM 及び 0.42μM であり、ダロルタミドの抑制はエンザルタミド及びアパルタミドより強かった。

表 2.6.2.2- 5 前立腺癌細胞株 VCaP のアンドロゲン誘発細胞増殖に対するビカルタミド、ダロルタミド及び M-1 の作用

	Compound		
	Bicalutamide	Darolutamide	Keto-darolutamide (M-1)
IC_{50} (μM)	1.36/1.09 (1.2)	0.51/0.60/0.44 (0.52±0.08)	0.79/0.57/0.62 (0.66±0.12)
Inhibition (%)	67/62 (65)	94/101/98 (98±4)	95/100/94 (96±3)

Individual value of 2-3 independent experiments.
Mean or mean±SD are presented in parenthes.
Inhibition = inhibition-% of 0.1 nM mibolerone-induced cell proliferation
Data source: R-9755

2.6.2.2.2 *In vivo* における特性

In vivo において、未成熟ラットにダロルタミドを経口投与すると、抗アンドロゲン作用が認められた。また、ダロルタミドは、去勢マウス VCaP 細胞株異種移植モデル、並びに未去勢及び去勢マウスの VCaP 細胞株同所性異種移植モデルにおいて、抗腫瘍効果を示した。*In vivo* 有効性は AR に F877L 変異を有するエンザルタミド抵抗性 MR49F 前立腺癌モデルにおいても認められている[1)]。未去勢マウス VCaP 細胞株同所性異種移植モデルにおいて、ダロルタミドは血清テストステロン値に影響を及ぼさなかった。

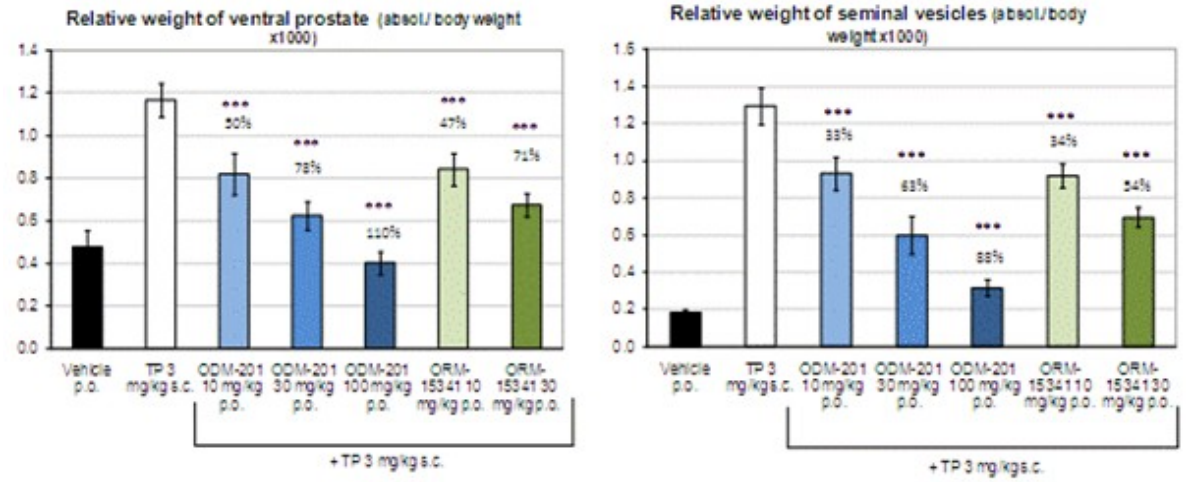
2.6.2.2.2.1 未成熟ラットを用いた試験

参照項目： 4.2.1.1.7 R-9756
4.2.2.2.7 R-9976

未成熟 SD ラットを用いて、アンドロゲン感受性組織である腹側前立腺及び精嚢腺のテストステロン誘発性増殖（相対重量変化）に対するダロルタミド及び M-1 の影響を評価した（Hershberger アッセイ変法）。プロピオン酸テストステロン〔ジメチルスルホキシド（DMSO）/sesame oil に溶解〕3mg/kg を皮下投与したラットに、ダロルタミド 10、30 及び 100mg/kg/日、又は M-1 10 及び 30mg/kg/日をそれぞれ 6 日間経口投与し、前立腺及び精嚢腺の重量を測定し、プロピオン酸テストステロン単独投与時の効果に対する相対阻害率を算出した（R-9756）。また、未成熟 SD ラットにダロルタミド 100mg/kg を 1 日 1 回 6 日間経口投与した際の血漿中及び組織中薬物濃度を測定し、曝露量を算出した（R-9976）。媒体として、マクロゴール＋プロピレングリコール＋5%グルコース（50:30:20、v/v/v）を用いた（R-9756、R-9976）。

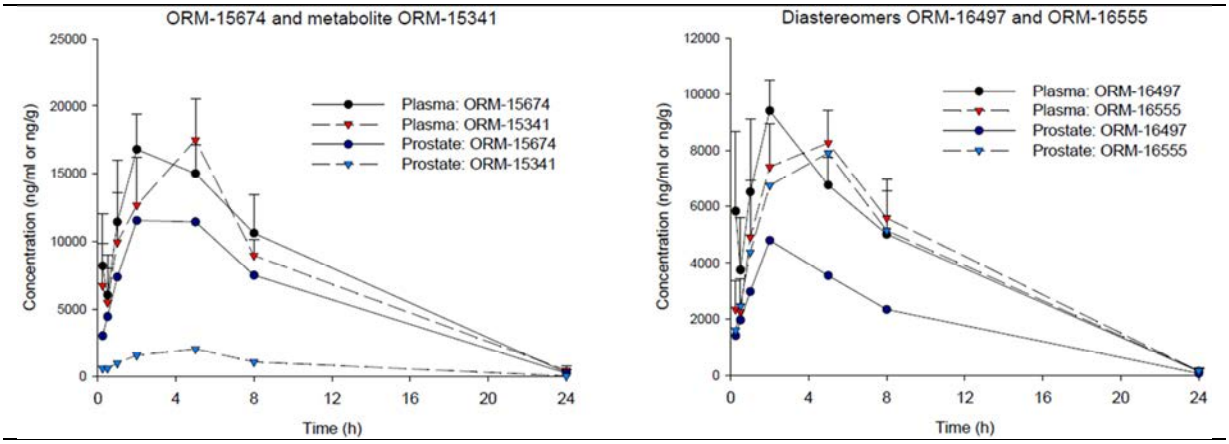
ダロルタミドは用量依存的かつ有意に前立腺及び精嚢腺の相対重量増加を抑制した。また、M-1 も同様に前立腺及び精嚢腺の相対重量増加を用量依存的かつ有意に抑制した。したがって、ダロルタミド及び M-1 は AR 拮抗作用により、テストステロン誘発性の腹側前立腺増殖及び精嚢腺増殖を抑制することが示唆された（図 2.6.2.2- 4）。ダロルタミド 100mg/kg を 1 日 1 回 6 日間経口投与後の血漿中及び前立腺組織中のダロルタミド、M-1 及びジアステレオマー（SR 体及び SS 体）の濃度推移は図 2.6.2.2- 5 に示す通りであった。血漿中ダロルタミド、M-1 及びジアス

テレオマーの薬物動態パラメータを表 2.6.2.2- 6 に示す（詳細は 2.6.5.4　Table 4-29 及び Table 4-30 を参照）。



Percentages represent relative inhibition of the effect of testosterone propionate (TP) 3 mg/kg.
Mean relative weights ± standard deviation (SD)　(n=8)
ODM-201: Darolutamide, ORM-15341: Keto-darolutamide (M-1)
*** p < 0.001 vs. group treated with TP 3 mg/kg　(One-way ANOVA)
Data source: R-9756

図 2.6.2.2- 4　　未成熟 SD ラットにおけるダロルタミド及び M-1 経口投与後の前立腺及び精嚢腺重量



mean±SD, n=4
ORM-15674: Darolutamide,　ORM-15341: Keto-darolutamide (M-1),　ORM-16497: (*S,R*)-darolutamide,
ORM-16555:　(S,S) darolutamide
Data source: R-9976

図 2.6.2.2- 5　　未成熟 SD ラットにダロルタミド（100mg/kg）投与後の血漿中及び前立腺中のダロルタミド、ジアステレオマー 及び M-1 濃度

表 2.6.2.2- 6 未成熟 SD ラットにダロルタミド（100mg/kg）投与後の血漿中ダロルタミド、ジアステレオマー及び M-1 の薬物動態パラメータ

Analyte	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	$C(24)/C_{max}$ (%)	AUC(0-24) (h·ng/mL)
Darolutamide	16808	2	1.83	194879
(*S,R*)-darolutamide	9400	2	1.62	95749
(*S,S*)-darolutamide	8255	5	1.89	99130
Keto-darolutamide (M-1)	17500	5	2.68	177964

mean values, n=4
Data source: R-9976

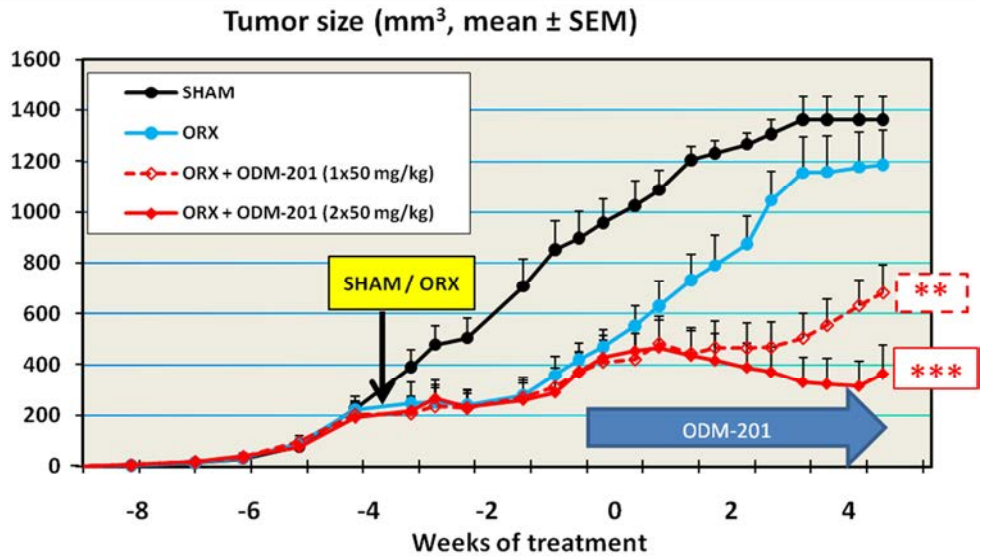
2.6.2.2.2.2 VCaP 細胞を用いた有効性試験及び薬物動態パラメータの検討

2.6.2.2.2.1 去勢雄マウスの VCaP 異種移植モデル

参照項目： 4.2.1.1.10 R-9762
4.2.2.2.4 R-9723
4.2.2.2.5 R-9919

VCaP 前立腺癌細胞株異種移植去勢抵抗性マウスモデルを用いて、ダロルタミドの抗腫瘍効果を検討した。雄性ヌードマウスの皮下に VCaP 細胞（2×10^6）を移植し、8 週間後、腫瘍体積（W^2 x L/2、W:短径、L:長径）が 200mm^3 以上となった時点で去勢した。腫瘍が再度増殖し始めた時点（去勢 4 週後）からダロルタミド 50mg/kg 1 日 1 回又は 1 日 2 回（7～8 時間間隔）経口投与を開始し、37 日間投与した。媒体として、マクロゴール＋プロピレングリコール＋5%グルコース（50:30:20, v/v/v）を用いた（R-9762）。

ダロルタミド 50mg/kg 1 日 1 回投与したマウスでは、未投与の去勢マウスと比べ有意に腫瘍増殖が緩徐となり（$p<0.01$）、ダロルタミド 50mg/kg 1 日 2 回 37 日間投与したマウスでは、未投与マウスに比べ腫瘍退縮が認められた（$p<0.001$）ことから、本前立腺癌モデルにおけるダロルタミド経口投与の抗腫瘍効果が確認された（図 2.6.2.2- 6）。

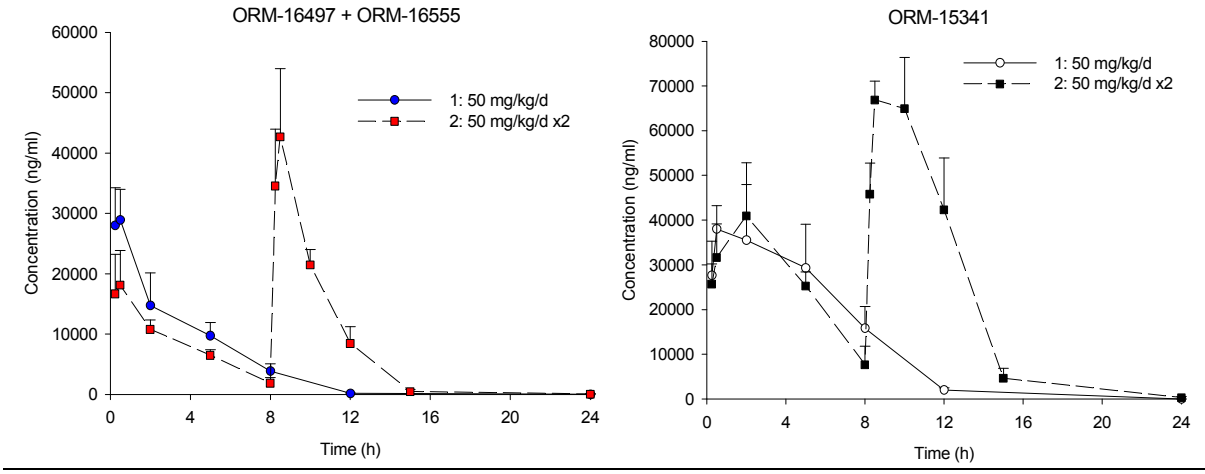


Mean size ± standard error of the mean (SEM) (mm^3), n = 6-11
***p < 0.001, **p < 0.01 vs. untreated castrated (ORX) mice (Repeated Measures ANOVA)
ODM-201: Darolutamide
Data source: R-9762

図 2.6.2.2- 6　VCaP 細胞株皮下移植マウスにおけるダロルタミド投与後の腫瘍体積

マウスでの有効曝露量を推定するために、ヌードマウス〔CAnN·Cg Foxn1nu/Crl（194 homozygous）〕にダロルタミド 50mg/kg を 1 日 1 回又は 1 日 2 回 7 日間経口投与し、血漿及び組織中のダロルタミド濃度を測定した（R-9723）。また、ダロルタミド 25 及び 100mg/kg 1 日 2 回投与についても同様に検討を行った（R-9919）。1 日 2 回投与は、朝 1 回目投与を行い、約 8 時間後に 2 回目の投与を行った。媒体として、マクロゴール＋プロピレングリコール＋5%グルコース（50:30:20, v/v/v）を用いた。

ダロルタミド及び代謝物 M-1 の血漿中濃度推移を図 2.6.2.2- 7 に示す。また、ジアステレオマー（SR 体及び SS 体）及び M-1 の薬物動態パラメータを表 2.6.2.2- 7 及び表 2.6.2.2- 8 に示す。SR 体及び SS 体の AUC の比は平均で約 0.78：0.22 であった。M-1 の曝露量は未変化体（SR 体及び SS 体の和）を上回っていた（血漿及び各組織中の薬物動態パラメータの詳細は 2.6.5.4 Table 4-1～Table 4-18 を参照）。有効用量と曝露量との関係については、2.6.2.2.3 で考察した。



Mean (+SD)
ORM-16497+ORM-16555: The concentrations of darolutamide were calculated as a sum of (*S,R*) darolutamide and (*S,S*) darolutamide, ORM-15341: M-1
Data source: R-9723

図 2.6.2.2- 7 ヌードマウスにおけるダロルタミド投与後の血漿中ダロルタミド（ジアステレオマーの和から算出）及び M-1 の濃度

表 2.6.2.2- 7 ヌードマウスにおけるダロルタミド投与後の血漿中ダロルタミド（ジアステレオマーの和から算出）の薬物動態パラメータ

Darolutamide dose (mg/kg/day)	n/time point	C_{max} (ng/mL)[a]	t_{max} (h)	C(24)/C_{max} (%)	AUC(0-24)[a] (h·ng/mL)
25 × 2	4-5	27608	8.5[b]	0.0217	108618
50 × 2	5	42712	8.5[b]	0.125	174807
100 × 2	5	57740	8.5[b]	1.75	224876

[a] Mean concentrations of darolutamide were calculated as a sum of (*S,R*)-darolutamide and (*S,S*)-darolutamide
[b] 0.5 h post second dose
Data source: R-9723 and R-9919

表 2.6.2.2- 8 ヌードマウスにおけるダロルタミド投与後のジアステレオマー及び M-1 の薬物動態パラメータ

Darolutamide dose (mg/kg/day)	Analyte	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	C(24)/C_{max} (%)	AUC(0-24) (h·ng/mL)
25 × 2	(*S,R*)-darolutamide	22240	8.5[a]	0.0225	89742
	(*S,S*)-darolutamide	5368	8.5[a]	0.0186	18876
	Keto-darolutamide	33760	10[b]	0.0859	234181
50 × 2	(*S,R*)-darolutamide	30820	8.5[a]	0.135	133263
	(*S,S*)-darolutamide	11892	8.5[a]	0.100	41544
	Keto-darolutamide	66900	8.5[a]	0.450	533522
100 × 2	(*S,R*)-darolutamide	39420	8.5[a]	2.04	166096
	(*S,S*)-darolutamide	18320	8.5[a]	1.15	58780
	Keto-darolutamide	98660	10[b]	3.98	763071

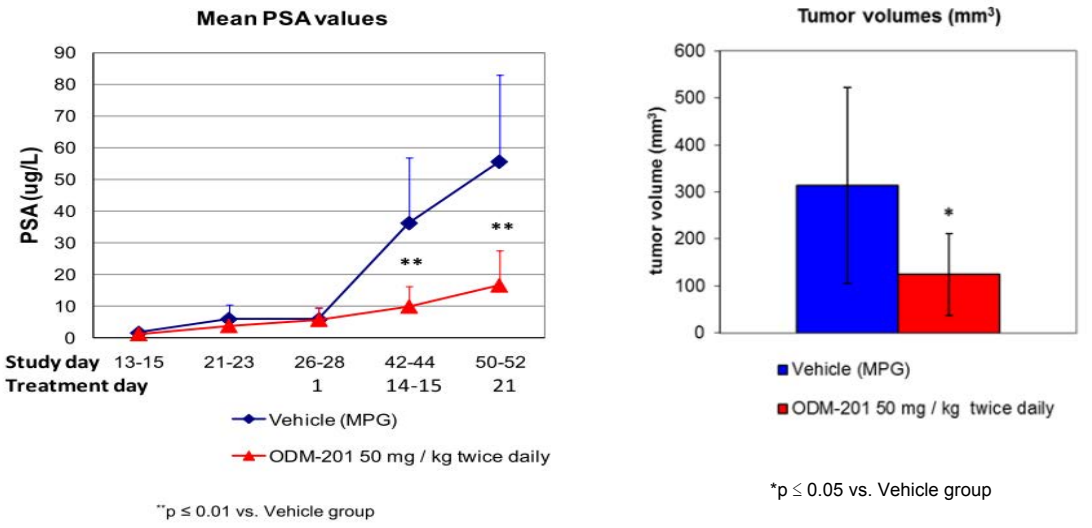
[a] 0.5 h post second dose, [b] 2h post second dose
n = 4-5/time point
Data source: R-9723 and R-9919

2.6.2.2.2.2.2　未去勢及び去勢雄マウスの VCaP 同所性異種移植モデル

参照項目：　4.2.1.1.8 R-9760
4.2.1.1.9 R-9761

未去勢マウスの前立腺癌同所性異種移植モデルとして、雄性ヌードマウスの前立腺に VCaP 細胞（1×10^6）を移植した。移植約 4 週後よりダロルタミド 50mg/kg を 1 日 2 回（7～8 時間間隔）3 週間経口投与し、経時的に血清 PSA、並びに試験終了時に血清テストステロン及び腫瘍体積（0.5×幅×長さ×高さ）を測定した。媒体としてマクロゴール＋プロピレングリコール＋5%グルコース（50:30:20, v/v/v）を用いた（R-9760）。

ダロルタミド投与群の腫瘍体積は媒体対照と比較して有意に低値であり（p≦0.05）、ダロルタミドによる腫瘍増殖抑制が示された（図 2.6.2.2- 8）。また、媒体対照と比較して、血清 PSA 値の上昇も抑制（p≦0.01）された（図 2.6.2.2- 8）。ダロルタミドは血清テストステロン値には影響を及ぼさなかった（R-9760）。



mean±SD, n = 8, Statistical method: One-way ANOVA
ODM-201: Darolutamide,
Data source: R-9760

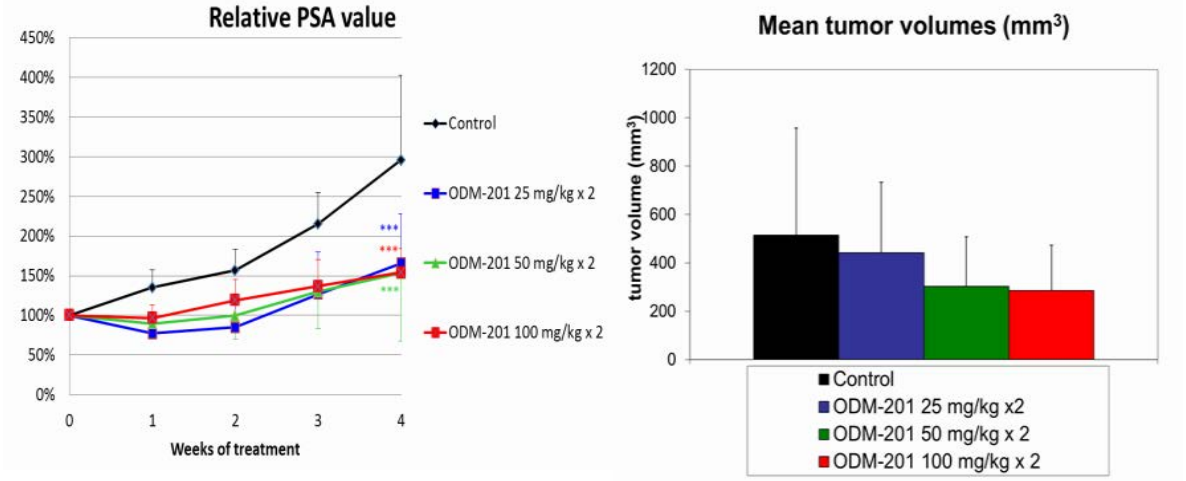
図 2.6.2.2- 8　VCaP 細胞株同所性異種移植未去勢マウスにおけるダロルタミド投与後の血清 PSA レベル及び腫瘍体積

去勢マウスの前立腺癌同所性異種移植モデルとして、雄性ヌードマウスの前立腺に VCaP 細胞（1×10^6）を移植した。平均血清 PSA レベルが 17μg/L に達した時点で去勢した。去勢 5～6 週後より、ダロルタミド 25、50 及び 100mg/kg を 1 日 2 回（7～8 時間間隔）4 週間経口投与し、経時的に血清 PSA を測定し、試験終了時に腫瘍体積（0.5×幅×長さ×高さ）を測定した。また、ダロルタミド及び M-1 の血清中及び腫瘍中濃度を最終投与の 2～3 時間後（血清中での t_{max} 付近）に採取した試料を用いて測定した。媒体として、マクロゴール＋プロピレングリコール＋5%グルコース（50:30:20, v/v/v）を用いた（R-9761）。

ダロルタミド投与群すべてで、投与開始時と比較した投与 4 週後の相対血清 PSA 値が媒体対照と比べ有意に低値を示し（p≦0.001）、ダロルタミドによる相対血清 PSA 値上昇の抑制が示された（図 2.6.2.2- 9）。腫瘍体積も用量依存的に低下する傾向を示し、最高用量の 100mg/kg 1 日

2 回投与で最も高い効果が得られたが、本試験では群内変動が大きく、腫瘍体積の低下は統計学的には有意ではなかった（図 2.6.2.2- 9）。

ダロルタミド及び M-1 の血清中及び腫瘍中濃度を測定した結果（R-9761 Appendix 5）、低～中用量群間では、血清中濃度は用量比をわずかに超えて増加〔約 3 倍（ダロルタミド：5,800 から 16,500ng/mL、M-1：14,700 から 42,900ng/mL）〕し、腫瘍中濃度はほぼ用量比例的に増加した（ダロルタミド：3,500 から 7,900ng/mL、M-1：2,000 から 4,600ng/mL）。中～高用量群間では、両濃度とも増加はわずかであった（高用量群の血清中ダロルタミド：16,600ng/mL、M-1：52,100ng/mL、並びに腫瘍中ダロルタミド：10,300ng/mL、M-1：5,300ng/mL）。なお、ヌードマウスに上記と同一用量を 7 日間経口投与後の定常状態の全身曝露量のデータは図 2.6.2.2- 7、表 2.6.2.2- 7 及び表 2.6.2.2- 8 に示している。



mean ± SD, n = 7-11, ***p≤0.001 vs. vehicle group (One-way ANOVA)
ODM-201: Darolutamide
Data source: R-9761

図 2.6.2.2- 9　VCaP 細胞株同所性異種移植去勢マウスにおけるダロルタミド投与後の相対血清 PSA レベル及び腫瘍体積

2.6.2.2.3　PK/PD 評価

PSA は、前立腺癌の治療応答性を調べるためのバイオマーカーとして認知されていることから、ヒトと動物種間で有効性を比較するパラメータとして PSA 抑制効果を選択した。nmCRPC の臨床試験（5.3.5.1.1 PH-39723 試験 17712）における投与量は、mCRPC 患者の臨床試験（5.3.3.2.1 R-9584 試験 17829）における PSA 抑制効果も考慮されて、600mg 1 日 2 回が選択されている。

薬理試験における推定有効 AUC を、異種移植マウスモデルにおける有効用量での全身曝露に基づき推定した。異種移植マウスモデルにおける腫瘍増殖抑制の有効用量はおおむね 50mg/kg 1 日 2 回経口投与であった（図 2.6.2.2- 6、図 2.6.2.2- 8、図 2.6.2.2- 9）。相対血清 PSA 値上昇の有意な抑制（p≦0.001）は、25、50 及び 100mg/kg 1 日 2 回で認められ（図 2.6.2.2- 9）、最低用量である 25mg/kg 1 日 2 回からほぼ最大に近い抑制が認められたことから、マウスに 25mg/kg 1 日 2 回投与時の全身曝露量を臨床との比較に用いた。

マウスに 25mg/kg 1 日 2 回投与後のダロルタミドの定常状態での曝露量 AUC(0-24)は、108,618ng·h/mL であった（表 2.6.2.2- 7）。マウス血漿中でのダロルタミドの非結合型分率

4.7%（2.6.4.4.1）に基づき、定常状態での有効曝露量は、非結合型 AUC(0-24)で 5,110ng·h/mL と算出された。

ヒトにおける 600mg 1 日 2 回投与後の定常状態での AUC(0-24)は、健康男性被験者で 57,600 ng·h/mL（2.7.6.6 表 2.7.6.6-11、AUC(0-12)から算出）、転移性前立腺癌患者で 67,600ng·h/mL（500mg と 700mg 1 日 2 回投与時の平均）であった（2.7.6.3 表 2.7.6.3-13）。ヒト血漿中でのダロルタミドの非結合型分率 8.0%（2.6.4.4.1）に基づくと、定常状態での有効曝露量は、非結合型 AUC(0-24)でそれぞれ 4,610 及び 5,408ng·h/mL と推定された。これは前述のマウスで PSA の抑制が認められた 25mg 1 日 2 回投与後の曝露量と同レベルであった。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 特異性

2.6.2.3.1.1 種々の受容体及び酵素

参照項目： 4.2.1.2.2 R-9872
4.2.1.2.3 R-9873
4.2.1.2.4 R-9874

100 種類以上の受容体及び酵素を用いて、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1（5μM 又は 10μM）の *in vitro* オフターゲット作用を検討した。

受容体に対する結合については放射性リガンド結合試験により、また酵素活性に対する影響については酵素分析試験により検討した（2 回測定）。50%以上の受容体結合阻害又は酵素活性阻害が認められた場合、「有意」と判定した。

ダロルタミド（10μM）はヒトのプロゲステロン受容体、ラットの中枢性ベンゾジアゼピン受容体及びヒトのセロトニン（5-HT）トランスポーターをそれぞれ 76%、58%及び 85%有意に阻害した（R-9872）。また SR 体及び SS 体（いずれも 5μM）はラットの中枢性ベンゾジアゼピン受容体をそれぞれ 48%及び 27%阻害し、ヒトの 5-HT トランスポーターをそれぞれ 56%及び 64%有意に阻害した（R-9874）。更に M-1（10μM）はヒトのプロゲステロン受容体、5-HT トランスポーター及びアデノシン A3 受容体をそれぞれ 62%、86%及び 53%有意に阻害した（R-9873）。

ダロルタミド、SR 体及び SS 体の中枢性ベンゾジアゼピン受容体に対する阻害作用、並びに M-1 のアデノシン A3 受容体に対する阻害作用は弱かったことから、追加の濃度－反応試験は行わなかった。

2.6.2.3.1.2 プロゲステロン受容体、5-HT トランスポーター及び $GABA_A$ 受容体

参照項目： 4.2.1.2.1 R-9871
4.2.1.2.5 R-9875
4.2.1.2.6 R-9876

前述した放射性リガンド結合試験において、ダロルタミド及び M-1 で結合阻害作用がみられたプロゲステロン受容体及び 5-HT トランスポーターについて、それぞれ転写活性化試験及び機能分析試験により更に検討した。また、$GABA_A$ 阻害による痙攣発作誘発作用は、第二世代の AR シグナル伝達阻害薬のオフターゲット作用として知られているため[2)]、$GABA_A$ 受容体に対するダロルタミド及び M-1 の影響について機能分析試験により検討した。

プロゲステロン受容体（R-9876）：プロゲステロン応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を組み込んだ、プロゲステロン発現プラスミドベクターを導入したヒト骨肉腫細胞株（U2-OS）を用いて、ダロルタミド及び M-1 のプロゲステロン受容体を介する転写活性を検討した。8 種類の濃度の被験薬（10nM～30μM）について測定した（3 回測定）。陽性対照には AR シグナル伝達阻害薬ビカルタミドを用いた。ダロルタミド及び M-1 はビカルタミドと同様に、プロゲステロン受容体に対する阻害作用を示し、その IC_{50} 値はそれぞれ 5.1μM 及び 4.5μM であった（ビカルタミド：4.1μM）。

5-HT トランスポーター（R-9871）：ラット脳より調製したシナプトソームに 5-HT 及びダロルタミド（1nM～10μM）を添加後、5-HT の取り込みに対するダロルタミドの影響を検討した（2 回測

定）。ダロルタミドは 5-HT の取り込みを濃度依存的に阻害し、その IC_{50} 値は 3.4μM であった。陽性対照に用いた、5-HT 取り込み阻害薬イミプラミンの IC_{50} 値は 62nM であった。

$GABA_A$ 受容体（R-9875）：ラット脳より単離した線条体神経細胞を用いたホールセルパッチクランプ法により、$GABA_A$ 受容体に対するダロルタミド及び M-1 の影響を検討した。単離した線条体神経細胞に GABA を添加後、ダロルタミド又は M-1（3、10 及び 30μM）を添加したところ、ダロルタミドと M-1 は共に、GABA により活性化された電流を濃度依存的に阻害した（n＝2～6 細胞／被験薬濃度）。その IC_{50} 値はそれぞれ 5.5μM 及び 3.4μM であった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 が生命維持に重要な器官系〔心血管系（心電図を含む）、呼吸器系〕及び胃腸管に及ぼす影響を検討した。試験は各被験物質について、*in vitro* 及び単回投与による *in vivo* で実施した。またダロルタミドの動脈圧及び心電図、並びに中枢神経系に及ぼす影響については、毒性試験において検討した。重要な試験はすべて、特記しない限り、GLP に従い実施した。試験は複数の試験施設で実施した（2.6.3）。

2.6.2.4.1 心血管系

2.6.2.4.1.1 *In vitro* 試験

2.6.2.4.1.1.1 hERG カリウムチャネル

参照項目：4.2.1.3.1 R-9683

hERG カリウムチャネルを安定して発現するヒト胎児腎臓（HEK）細胞を用いて、ホールセル電位固定法により、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1〔1、3、10 及び 30μM（媒体：DMSO）〕が生理的温度下（36±1℃）での hERG テール電流に及ぼす影響を検討した（n＝2～6 細胞／被験薬濃度）。陽性対照には E-4031（100nM）を用いた（n＝5 細胞）。

ダロルタミドは hERG テール電流を濃度依存的に阻害し、最高濃度 30μM では 34.5%の阻害がみられた。IC_{50} 値を外挿した結果、87.9μM が得られた。SR 体、SS 体及び M-1 においても hERG テール電流に対する濃度依存的な阻害作用がみられ、IC_{50} 値はそれぞれ 11.5μM、30.2μM 及び 8.0μM であった。なお、陽性対照 E-4031 では hERG テール電流に対する 92.1%の阻害がみられ、これは E-4031 における既知の薬理活性に一致した。

2.6.2.4.1.1.2 L 型カルシウムチャネル

参照項目：4.2.1.3.5 R-9689

L 型カルシウムチャネルを内因性に発現するヒト神経芽腫細胞株（IMR-32）を用いて、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1（1、3、10、30 及び 100μM）が生理的温度下（37℃）での細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響を検討するため、蛍光カルシウム指示薬 Fluo-4 を用いた蛍光イメージングによって測定した（2～4 回測定／被験薬濃度）。陽性対照にはカルシウムチャネル阻害薬ベラパミル及びニカルジピンを用い、比較対照には AR シグナル伝達阻害薬ビカルタミドを用いた。

ダロルタミドは塩化カリウムにより誘導した細胞内カルシウム濃度の増加を濃度依存的に阻害し、IC_{50} 値は 37.4μM であった。SR 体、SS 体及び M-1 の IC_{50} 値は、それぞれ 42.5μM、46.6μM 及び 22.5μM であった。一方、比較対照としたビカルタミドにおいても L 型カルシウムチャネルの阻害作用がみられ、その IC_{50} 値は 12.9μM であった。なお、陽性対照としたベラパミル及びニカルジピンの IC_{50} 値は、それぞれ 4.1μM 及び 0.6μM であった。

2.6.2.4.1.2 *In vivo*試験

2.6.2.4.1.2.1 静脈内投与（麻酔イヌ）

参照項目： 4.2.1.3.7 R-9691/R-12429
4.2.1.3.6 R-9690/R-12430

ダロルタミド及びSS体の心血管系に及ぼす影響について、麻酔イヌを用いて検討した。

麻酔下〔チオペンタールの静脈内投与（20mg/kg）及び4%ハロタンで誘導後、2～2.4%ハロタンで維持〕の雄性イヌ（ビーグル4例、体重11.75～13.00kg）に、ダロルタミドを0〔媒体：マクロゴール＋プロピレングリコール＋5%グルコース（50:30:20, v/v/v）〕、3、10及び20mg/kgの順に30分間隔で静脈内投与した（それぞれ1mL/kgを30秒間で投与）（R-9691/R-12429）。各用量投与後30分まで心血管系パラメータ（心電図を含む）を継続的に測定した。また、動脈血液ガスを測定するため、媒体投与前及び各用量投与後30分に血液を採取した。更に、ダロルタミドの血漿中濃度を測定するため、媒体投与前及び各用量投与後2、5及び30分に血液を採取した。

ダロルタミドの10mg/kg及び20mg/kgにおいて、動脈血圧の低下がみられ、末梢における血管拡張の誘発が示唆された。また平均冠血流量の一過性の増加がみられた。20mg/kgにおいて、心拍出量の一過性の増加、並びに短時間のわずかな心室再分極時間（QT間隔及び心拍数で補正したQTc間隔）の短縮がみられた。また動脈血液pHの低下がみられた。最低用量3mg/kgにおいて、動脈血圧及び平均大腿血流量の一過性でわずかな低下がみられた〔それぞれ－2%（投与前値からの変化率）；p≦0.01 vs 媒体（12%）、及び最大－17%（投与前値からの変化率）；p≦0.01 vs 媒体（3%）〕。これらの結果から、ダロルタミド静脈内投与後の心血管系パラメータに関する無毒性量（NOAEL）は3mg/kgと考えられた。

イヌにおけるダロルタミドのC_{max}は、各用量を静脈内投与後の最初の採血時点（投与後2分）で観察された。すなわち、3、10及び20mg/kg投与後のC_{max}〔投与後2分の血漿中濃度（C_{2min}）〕の平均値は、それぞれ9,285、27,250及び46,275ng/mLであった〔$C_{max,u}$はそれぞれ780、2,290及び3,890ng/mL；イヌにおける非結合型分率（fu）8.4%（2.6.4.4.1 表2.6.4.4-3）〕。

また、麻酔下（ハロタン及びチオペンタール）の雄性イヌ（ビーグル4例、体重11.75～13.35kg）にSS体を0、1、3及び10mg/kgの用量で順に静脈内投与した（試験方法はR-9691/R-12429と同じ）（R-9690/R-12430）。

SS体の最低用量1mg/kgにおいて、動脈圧及び平均大腿血流量の一過性でわずかな低下がみられた。3mg/kg及び10mg/kgにおいて、動脈血圧の低下がみられ、血管拡張が示唆された。また、心拍数で補正したQTc間隔）の短縮がみられた。10mg/kgにおいて、平均冠血流量の一過性の顕著な増加がみられた。また、4例中1例において、投与後約7～45分の間に可逆性の房室結節の異常（完全房室ブロック）がみられた。投与後45分には、この不整脈発作は消失したが、PQ及びPR間隔の延長は持続していた。完全房室ブロックの発現前にはPQ又はPR間隔の延長は認められなかった。SS体の投与に起因する心拍数の変化はみられず、他の動物及び他の用量において、PQ及びPR間隔に問題となる変化は認められなかった。以上より、麻酔下でイヌにSS体を静脈内投与後の心血管系パラメータに関するNOAELは1mg/kgと考えられた。

SS 体の C_{max} はダロルタミドと同様に、各用量投与後の最初の採血時点（投与後 2 分）で観察された。1、3 及び 10mg/kg の C_{2min} の平均値は、それぞれ 4,000、9,280 及び 27,200ng/mL であった〔$C_{max,u}$ [a)] は、それぞれ 336、780 及び 2,285ng/mL〕。

2.6.2.4.1.2.2 経口投与（覚醒イヌ）

参照項目： 4.2.3.2.8 R-9667
4.2.3.2.9 R-9672
4.2.3.2.10 R-9679

雌雄ビーグル犬を用いた反復投与毒性試験において、心血管系に対するダロルタミドの経口反復投与の影響を評価した。以下の 3 試験において、連日強制経口投与後の動脈圧及び心電図に対する影響を検討した。なお、いずれの試験においても媒体には 0.5%（w/v）メチルセルロース／0.5%（v/v）Tween 80 水溶液を用いた。

28 日間試験（R-9667）：ダロルタミドの 0（媒体）、50、200 及び 800mg/kg（懸濁液）を雄性イヌ（体重 7.7～12.6kg）に 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した（n＝4、5mL/kg）。心電図及び動脈圧（収縮期及び拡張期動脈圧）は試験開始前、並びに 1 及び 4 週目の各投与前、各投与後 1 及び 4 時間に拘束／覚醒下で測定した。

13 週間試験（R-9672）：ダロルタミドの 0（媒体）、25、75 及び 200mg/kg（懸濁液）を雌雄イヌ（雄：体重 6.9～8.8kg、雌：体重 5.6～7.7kg）に 1 日 2 回（8 時間間隔）13 週間強制経口投与した（各投与群雌雄各 4～6 例、2.5mL/kg）。動物には体外式テレメータ用ジャケット（JET）を装着させ、心電図信号を投与の少なくとも 1 時間前から投与後 24 時間まで継続的に受信し記録した。また動脈圧（収縮期及び拡張期動脈圧）はテレメトリーへの影響を避けるために、心電図評価と同じ週（試験開始前、並びに 6 及び 13 週目）の別の日に、同じ測定時間（各投与前、各投与後 2 及び 4 時間）において拘束／覚醒下で測定した。

39 週間試験（R-9679）：ダロルタミドの 0（媒体）、25、75 及び 200mg/kg（懸濁液）を雌雄イヌ（雄：体重 8～10kg、雌：体重 5～8kg）に 1 日 2 回（8 時間間隔）39 週間強制経口投与した（各投与群雌雄各 4～6 例、2.5mL/kg）。心電図及び動脈圧（収縮期及び拡張期動脈圧）は試験開始前、並びに 13、26 及び 39 週目の各投与前、各投与後 2 時間に拘束／覚醒下で測定した。

いずれの試験においても、ダロルタミドは収縮期、拡張期及び平均動脈圧に影響を及ぼさなかった。また心電図波形やリズムについて、ダロルタミドによる明らかな変化を示唆する所見はみられなかった。PR、QRS 及び QT 間隔、並びに心拍数で補正した QTc 間隔〔Fridericia 式及び Van de Water 式で補正〕を含む心電図パラメータに統計学的に有意な変化はみられなかった。

28 日間試験において、ダロルタミド及び M-1 の C_{max} は 800mg/kg 投与の 1 日目にそれぞれ 12,300ng/mL 及び 14,500ng/mL に達した。13 週間試験では、ダロルタミド及び M-1 の C_{max} は、2×200mg/kg/日の投与 1 日目にそれぞれ 6,229～8,972ng/mL 及び 7,547～10,878ng/mL に達した。また、39 週間試験では、ダロルタミド及び M-1 の C_{max} は、2×200mg/kg/日の投与 1 日目にそれぞれ 12,573～13,910ng/mL 及び 13,500～13,883ng/mL に達した。

---

a）イヌにおける血漿タンパク結合率は濃度に依存して変動する。イヌ血漿中の SS 体の非結合型濃度の算出には、2 種類のジアステレオマーの血漿タンパク結合率に差は認められなかったことから、ダロルタミド 5,000ng/mL の非結合型分率（8.4%）を用いた。

2.6.2.4.2 呼吸器系

参照項目： 4.2.1.3.3 R-9687

ダロルタミドの 0〔媒体：0.5%（w/v）メチルセルロース／0.5%（v/v）Tween 80 水溶液〕、100、300 及び 1,000mg/kg（懸濁液）を覚醒下の雄性ラット〔Han Wistar CRL：WI（Han）、体重 224～273g〕に単回強制経口投与し、プレチスモグラフィーにより呼吸機能を検討した（n＝5、10mL/kg）。投与前、投与後 2、5 及び 24 時間において、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量を測定した。

全体的な成績として、いずれの用量においても呼吸機能パラメータに投与に関連した問題となる影響はみられなかった。なお、1,000mg/kg 投与群において、投与後 5 及び 24 時間にみられた 1 回換気量〔媒体群に比しそれぞれ－32%及び－24%〕及び分時換気量（媒体群に比しそれぞれ－25%及び－18%）の低下がみられたものの、これらは偶発的な変化であり、投与に関連したものではないと考えられた。

2.6.2.4.3 中枢神経系

参照項目：4.2.3.2.4 R-9668

ラット 28 日間反復投与毒性試験において、ダロルタミドの中枢神経系に対する評価を実施した。ダロルタミドの 0〔媒体：0.5%（w/v）メチルセルロース／0.5%（v/v）Tween 80 水溶液〕、100、300 及び 1,000mg/kg（懸濁液）を雌雄ラット〔Han Wistar CRL：WI（Han）、体重 210～281g（雄）及び 132～191g（雌）〕に 1 日 1 回 28 日間、強制経口投与した（各群雌雄各 10 例、10mL/kg）。トキシコキネティクスの評価にあたっては、サテライト動物より投与 1 日目に血液を採取した（各群雌雄各 8 例）。一般状態観察に加え、体温測定を含む、詳細な機能観察総合評価（FOB）を試験開始前及び試験期間中の 1 週間に 1 回（投与後 3～6 時間）実施した。また機能試験として、握力、痛覚認知、着地開脚幅及び自発運動についても検討した。

投与期間全体にわたって、いずれの用量においても、一般状態、体温、及び行動評価（自発運動を除く）に対し、問題となる急性及び亜急性の作用はみられず、忍容性は良好であった。300 及び 1,000mg/kg/日の用量において、雌雄共に自発運動の低下傾向がみられ、これは一般状態観察でみられた警戒性低下（雄）と関連性のある可能性が示唆された。

なお、1 日目に最高用量（1,000mg/kg）を投与したときのダロルタミド及び M-1 の C_{max} の平均値は、雄でそれぞれ 22,100ng/mL 及び 23,500ng/mL であった。

2.6.2.4.4 胃腸管系

参照項目： 4.2.1.3.4 R-9688
4.2.1.3.2 R-9686

ダロルタミドの腸管内輸送能及び胃内容排出能に対する影響を評価するため、ラットを用いた炭末輸送試験を実施した。覚醒下で絶食させたラットにダロルタミドの溶液又は懸濁液を単回強制経口投与した。

ダロルタミドの溶液を用いた試験（R-9688）では、媒体としてマクロゴール＋プロピレングリコール＋5%グルコース（50:30:20, v/v/v）を用い、ダロルタミドの 0（媒体）、30 及び 100mg/kg を雄性ラット（Wistar：HsdRCCHan Wist、体重 194.48～275.39g）に投与した（n＝7 又は 8、5mL/kg）。また、ダロルタミドの懸濁液を用いた試験（R-9686）では、媒体として 0.5%（w/v）メチルセルロース／0.5%（v/v）Tween 80 水溶液を用い、ダロルタミドの 0（媒

体）、30、100、300 及び 1,000mg/kg を雄性ラット（Wistar：HsdRCCHan Wist、体重 193.50～252.98g）に投与した（n＝8、5mL/kg）。

いずれの試験においても、媒体又は被験薬投与後 4 時間に炭末懸濁液を強制経口投与し、更に 15 分後に屠殺し胃及び腸を摘出した。腸については炭末の移動距離を測定し、胃については総重量及び空重量を測定し、それぞれ腸管内輸送能及び胃内容排出能を評価した。

ダロルタミドの溶液投与試験では、用量依存的に腸管内輸送が低下し〔100mg/kg における腸全長に対する移動割合 41.7%（媒体：60.2%）〕、胃内容排出が抑制された〔100mg/kg における胃内容物 3.99g（媒体：1.31g）〕。一方、ダロルタミドの懸濁液投与試験では、最高用量 1,000mg/kg まで、腸管内輸送能及び胃内容排出能のいずれに対しても影響はみられなかった。300 及び 1,000mg/kg のダロルタミド懸濁液を投与したすべてのラットにおいて、腸管内に不溶性の被験薬が認められた。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

ダロルタミドは *in vitro* において、AR に対して高親和性で選択的に結合し、hAR に対して拮抗作用を示した。

AR を過剰発現した HS-HEK293 細胞において、ダロルタミドはビカルタミドとは異なる、より好ましい拮抗作用プロファイルを示した。すなわち、ダロルタミドは HS-HEK293 細胞のテストステロンによる AR の核内移行を、ビカルタミドと比較してより強く抑制することが示された。同様の試験において、エンザルタミド及びアパルタミドの AR 核内移行の抑制は、ダロルタミドと類似していた（4.2.1.1.11 Scientific Reports 2015_5_12007）。また、CRPC 患者骨転移巣由来であり内因性 AR 遺伝子増幅及び AR 過剰発現の VCaP 細胞株において、ダロルタミドはビカルタミドよりも強力に、アンドロゲン誘発性の細胞増殖を濃度依存的に抑制した。ダロルタミドによる抑制は、エンザルタミド及びアパルタミドよりも強かった。

前立腺癌において、AR の W742L 変異は一部の AR シグナル伝達阻害薬に対する抵抗性をもたらす。この変異 AR に対し、ダロルタミド及び主要代謝物 M-1 は拮抗作用を示した。一方、ビカルタミドは純粋な作働薬として作用し、エンザルタミド及びアパルタミドの拮抗作用は低下した。また、F877L 変異はエンザルタミド及びアパルタミドに対する抵抗性をもたらす。この変異 AR に対し、ダロルタミド及び M-1 は拮抗作用を示した。一方、エンザルタミド及びアパルタミドは部分作働薬として作用した。T878A 変異に対しても、ダロルタミド及び M-1 は拮抗作用を示した。

In vivo 薬理試験において、未成熟ラットを用いた試験では、ダロルタミドは 10～100mg/kg/日投与で AR 拮抗作用による抗アンドロゲン作用を示した。また、VCaP 細胞異種移植去勢マウス、並びに VCaP 細胞同所性異種移植未去勢及び去勢マウスにおいて、ダロルタミドは抗腫瘍効果を示した。未去勢マウスにおいて、ダロルタミドは血清テストステロン値に影響を及ぼさなかった。ダロルタミド経口投与による腫瘍増殖抑制効果は、50mg/kg 1 日 2 回で認められた。血清 PSA 値上昇の抑制は、25mg/kg 1 日 2 回でみられた。PSA の抑制は、動物とヒトにおける有効性を比較できるパラメータと考えられる。ヒト（健康被験者及び前立腺癌患者）に 600mg 1 日 2 回投与時の定常状態における非結合型 AUC(0-24)は、それぞれ 4,610 及び 5,408ng·h/mL であった。この値は、マウスにおいて PSA 抑制が認められた 25mg/kg 1 日 2 回投与時の非結合型 AUC(0-24)の 5,110ng·h/mL とほぼ同等であった。

100 種類以上の受容体及び酵素に対するダロルタミド、SS 体、SR 体及び M-1 のオフターゲット作用を *in vitro* で評価したところ、ヒトにダロルタミド 600mg を 1 日 2 回経口投与後において、これらによるオフターゲット作用が発現する可能性は低いと考えられる。

In vitro 機能試験において、ダロルタミドは 5-HT の取り込み及び $GABA_A$ 受容体を濃度依存的に阻害した。しかし、ダロルタミドの 5-HT の取り込み及び $GABA_A$ 受容体阻害に関する IC_{50} 値は、AR 阻害の IC_{50} 値に比しそれぞれ 50 倍及び 80 倍以上高かった。加えて、ダロルタミド及び M-1 の脳／血漿中濃度比は低いことから（2.6.4.4.2）、5-HT の取り込み及び $GABA_A$ 受容体阻害により中枢神経系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。したがって、第二世代の AR シグナル伝達阻害薬のオフターゲット活性として知られる痙攣発作[2)] のリスクは、ダロルタミドでは低いものと考えられる。しかし、ダロルタミドの末梢における局所濃度が高くなった場合には、末梢での影響がみられる可能性が考えられる（胃腸管など）。

ダロルタミドをラットに単回投与した呼吸機能試験、及びラット 28 日間反復投与毒性試験における中枢神経系の安全性評価の成績から、ダロルタミドは最高用量 1,000mg/kg まで忍容性は良好であった。すなわち、呼吸機能及び中枢神経系に生理学的に問題となる急性の影響はみられなかった。なお、ラット 28 日間反復投与毒性試験において、300 及び 1,000mg/kg/日の投与後 3

週目に、雌雄共に自発運動の低下傾向がみられ、雄では警戒性低下と関連性のある可能性が示唆されたものの、投与に関連した神経行動学的な異常は認められなかった。前述したように脳／血漿濃度比は低く、中枢神経系に対し影響を及ぼす可能性は低いと推測されることから、当該所見の機序及び意義は不明である。当該所見は偶発的、もしくはアビラテロン酢酸エステルの安全性薬理試験でも警戒性低下の所見が報告されているように[3, 4]、アンドロゲン除去に関連したものである可能性が示唆される。

胃腸管機能を検討した試験において、ダロルタミドの溶液を 30mg/kg 以上の用量で絶食下の雄性ラットに投与したとき、胃内容排出及び腸管内輸送の遅延がみられた。しかし、ダロルタミドの懸濁液を用いた場合には、1,000mg/kg まで影響はみられなかった。ダロルタミドの溶液を雄性ラットに 30mg/kg で投与したときの薬物動態データは得られていないが、100mg/kg 投与時のダロルタミドの C_{max} は 16,808ng/mL〔$C_{max,u}$：908ng/mL、2.3μM（fu＝5.4％、2.6.4.4 表 2.6.4.4-2）〕であった（4.2.2.2.7 R-9976）。このことから、ダロルタミドの溶液投与による胃腸管に対する影響は、ダロルタミドの C_{max} が 16,808ng/mL 未満の場合にも認められる可能性がある。一方、ダロルタミドの懸濁液を雄性ラットに最高用量 1,000mg/kg〔C_{max}：22,100ng/mL（$C_{max,u}$：1,193ng/mL、3μM）、4.2.3.2.4 R-9668〕を投与した場合には、胃腸管への影響はみられなかった。したがって、ダロルタミドの胃腸管への影響に対する機序は不明であるものの、製剤組成及び胃腸管におけるダロルタミドの局所の可溶性成分濃度に依存する可能性が考えられる。

ダロルタミドによる QT 間隔延長のリスクを検討するため、*in vitro*（hERG カリウムチャネル及び L 型カルシウムチャネル）及び *in vivo*（覚醒及び麻酔ビーグル犬の心電図記録における QT/QTc 間隔）試験を実施した。生理学的には問題とは考えられない、高濃度（IC_{50}：87.9μM）でのみ hERG カリウム電流の阻害がみられた。L 型カルシウムチャネルについても同様に高濃度でのみ阻害がみられた（IC_{50}：37.4μM）。イヌの心電図において、ダロルタミドを最高用量（20mg/kg）で投与後、ダロルタミドの $C_{max,u}$ が 3,890ng/mL（9.7μM）に達しても、QT/QTc 間隔の延長及び QT/QTc に関連した不整脈は認められなかった。

M-1、SR 体及び SS 体による QT 間隔延長のリスクを検討するために実施した同様の試験において、いずれも hERG カリウムチャネル及び L 型カルシウムチャネルに対し生理学的に問題となる影響はみられず、かつイヌにおける QT/QTc 間隔の延長に対する影響はみられなかった。

ダロルタミド及び SS 体を麻酔イヌに静脈内投与後の心血行動態を検討したところ、ダロルタミドの 10mg/kg 以上、及び SS 体の 3mg/kg 以上で動脈圧の低下がみられ、末梢における血管拡張の誘発が示唆された。いずれにおいても 10mg/kg 以上で冠血流量の増加がみられた。また、ダロルタミドの 20mg/kg、及び SS 体の 3mg/kg 以上で、短時間でわずかな QT/QTc 間隔の短縮がみられた。SS 体の最高用量（10mg/kg）を投与した 4 例のうち 1 例において、可逆性の完全房室ブロックがみられた。

麻酔イヌにおいて、心血管系に対する影響が認められた $C_{max,u}$（fu＝8.4％）を以下に示す。

・血管拡張作用：ダロルタミド：≧2,290ng/mL（5.7μM）、SS 体：≧780ng/mL（2μM）

・QT/QTc 間隔の短縮：ダロルタミド：3,890ng/mL（9.7μM）、SS 体：≧780ng/mL（2μM）

・完全房室ブロック：SS 体：2,285ng/mL（5.7μM）〔ダロルタミドは 3,890ng/mL（9.7μM）でも認められなかった〕

これらの作用はいずれも、ヒトにダロルタミド 600mg を 1 日 2 回経口投与したときに得られるダロルタミド及び SS 体の $C_{max,u}$ を十分に上回る血漿中濃度において認められた。

高濃度の $C_{max,u}$ でみられた血管拡張作用（ダロルタミド及び SS 体）、一過性の QT/QTc 間隔の短縮（ダロルタミド及び SS 体）及び房室ブロック（SS 体のみ）の機序及び原因は不明であるものの、L 型カルシウムチャネル阻害作用は高濃度（SS 体の IC_{50} 値 46.6μM 以上）で発現し、これはイヌの $C_{max,u}$（SS 体で 5.7μM）よりも十分に高いことから、L 型カルシウムチャネル阻害が原因である可能性は低いと考えられる。当該試験で用いた 2 種類の麻酔薬（ハロタン及びチオペンタール）は L 型カルシウムチャネル阻害作用及び房室結節を介した下流への伝導遅延作用が知られているため[5, 6, 7, 8, 9]、房室ブロックの発現は麻酔薬に起因した可能性の方がむしろ高いと考えられる。更に、イヌの房室ブロックの自然発生率は高いことが知られている[10]。また、経口投与に比し、特に麻酔下での急速静脈内投与及び急性作用では、より房室結節の変化を発現しやすいと考えられる。

心血管系への作用が麻酔イヌでみられたこととは明らかに異なり、覚醒イヌを用いた 28 日間、13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験において、ダロルタミドを最高用量（800mg/kg/日を 1 日 1 回又は 200mg/kg/日を 1 日 2 回）で連日強制経口投与しても、動脈圧、心電図波形やリズム、QT/QTc 間隔などの心電図パラメータに明らかな変化はみられなかった。当該試験において、ダロルタミドの C_{max} は最大 13,910ng/mL に達し、これは $C_{max,u}$ 1,168ng/mL（2.9μM）に相当した。

2.6.2.7　図表

図表は本文中に記載した。

引用文献一覧

1) Borgmann H et al., Eur Urol 2018:73:4-8 (4.3.16)

2) Foster WR et al., Prostate 2011:71(5):480-488 (4.3.2)

3) EMA, European Medicine Agency, Committee for Human Medicinal Products (CHMP), Assessment Report for Zytiga (abiraterone) 2011 (4.3.15)

4) FDA US, Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Abiraterone acetate (Zytiga) Pharmacology/Toxicology NDA review and evaluation 2011 (4.3.22)

5) Atlee JL 3rd., Anesthesiology 1988:68(4):519-528 (4.3.3)

6) Duerr FM et al., Can Vet J 2007:48(2):169-177 (4.3.6)

7) Fassl J et al., Anesthesiology 2003:99(1):90-96 (4.3.5)

8) Lee DL et al., Anesthesiology 1994:81(5):1212-1219 (4.3.4)

9) Porter GT et al., Grand Rounds Presentation, UTMB, Dept. of Otolaryngology 2004: 1-19 (4.3.1)

10) Ulloa HM et al., Am J Vet Res 1995:56(3):275-281 (4.3.7)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

試験一覧表は、2.6.3.2、2.6.3.3、2.6.3.4 及び 2.6.3.5 を参照。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

別途記載のない限り、すべての試験はOrion Corporation Orion Pharma（Turku、フィンランド）で行われた。

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Primary Pharmacodynamics - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Location in CTD (Report Number)
Inhibition of AR binding	Cytosolic lysate from castrated rat ventral prostate	*In vitro*	4.2.1.1.1 (R-9750)
Antagonism for AR wild-type	Cell-based transactivation assay in HEK293 cells	*In vitro*	4.2.1.1.2 (R-9751)
Inhibition of AR nuclear translocation	Immunofluorescence analysis of AR subcellular localization in HEK293 cells	*In vitro*	4.2.1.1.3 (R-9752)
Antagonism for AR mutants	Cell-based transactivation assay in U2-OS cells	*In vitro*	4.2.1.1.4 (R-9753) 4.2.1.1.5 (R-9754) 4.2.1.1.11 (Scientific Reports 2015:5:12007)
Inhibition of tumor cell proliferation in culture	VCaP cells	*In vitro*	4.2.1.1.6 (R-9755)
Inhibition of testosterone-induced growth of androgen target organs	Ventral prostate and seminal vesicle weight of immature rats stimulated with testosterone propionate	*In vivo*, oral	4.2.1.1.7 (R-9756) 4.2.2.2.7 (R-9976)
Anti-tumor efficacy in VCaP xenograft model	VCaP xenograft in castrated mice	*In vivo*, oral	4.2.1.1.10 (R-9762)
Anti-tumor efficacy in VCaP orthotopic model	VCaP orthotopic model in intact and castrated mice	*In vivo*, oral	4.2.1.1.8 (R-9760) 4.2.1.1.9 (R-9761)

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Primary Pharmacodynamics – *In vitro* studies

Type of Study	Test System	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report Number)
Inhibition of AR binding	Cytosolic lysate from castrated rat ventral prostate	K_i values: 9 nM darolutamide, 9 nM (*S,R*)-darolutamide, 19 nM (*S,S*)-darolutamide, 8 nM keto-darolutamide	4.2.1.1.1 (R-9750)
Antagonism for AR wild-type	Cell-based transactivation assay in HEK293 cells	IC_{50} values: 65 nM darolutamide, 38 nM (*S,R*)-darolutamide, 51 nM (*S,S*)-darolutamide, 25 nM keto-darolutamide	4.2.1.1.2 (R-9751)
Inhibition of AR nuclear translocation	Immunofluorescence analysis of AR subcellular localization in HEK293 cells	Concentration inducing ≥ 50% of control-induced (0.6 nM testosterone) nuclear vs. cytoplasmic ratio: ≥5 µM darolutamide, ≥1 µM keto-darolutamide	4.2.1.1.3 (R-9752)
Antagonism for AR mutant W742L	Cell-based transactivation assay in U2-OS cells	IC_{50} values: 1.1 µM darolutamide, 1.1 µM keto-darolutamide	4.2.1.1.4 (R-9753)
		IC_{50} values: 1.5 µM darolutamide, 1.2 µM keto-darolutamide agonist: bicalutamide >10 µM: enzaltamide >10 µM: apalutamide	4.2.1.1.11 (Scientific Reports 2015:5:12007)

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Primary Pharmacodynamics – *In vitro* studies (continued)

Type of Study	Test System	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report Number)
Antagonism for AR mutant F877L	Cell-based transactivation assay in U2-OS cells	IC_{50} values: 0.085 µM darolutamide, 0.047 µM keto-darolutamide agonist: enzaltamide agonist: apalutamide	4.2.1.1.5 (R-9754)
		IC_{50} values: 0.07 µM darolutamide, 0.05 µM keto-darolutamide agonist:enzaltamide agonist: apalutamide	4.2.1.1.11 (Scientific Reports 2015:5:12007)
Antagonism for AR mutant T878A	Cell-based transactivation assay in U2-OS cells	IC_{50} values: 2.6 µM darolutamide, 1.4 µM keto-darolutamide 0.8 µM bicalutamide	4.2.1.1.4 (R-9753)
		IC_{50} values: 1.8 µM darolutamide, 0.7 µM keto-darolutamide 0.3 µM: enzaltamide 1.1 µM: apalutamide agonist: OH-flutamide	4.2.1.1.11 (Scientific Reports 2015:5:12007)
Inhibition of tumor cell proliferation in culture	VCaP	IC_{50} values: 0.5 µM darolutamide, 0.65 µM keto-darolutamide	4.2.1.1.6 (R-9755)
		IC_{50} values: 0.23 µM darolutamide, 0.17 µM keto-darolutamide 0.41 µM enzalutamide 0.42 µM apalutamide	4.2.1.1.11 (Scientific Reports 2015:5:12007)

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Primary Pharmacodynamics – *In vivo* studies

Type of Study	Test System	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report Number)
Inhibition of testosterone-induced growth of androgen target organs	Ventral prostate and seminal vesicle weight of immature rats stimulated with testosterone propionate	Relative weight of ventral prostate was reduced by 50, 78 and 110 % following oral, daily treatment with 10, 30 and 100 mg/kg of darolutamide, in comparison to the 3 mg/kg, s.c., daily TP-stimulated group. Relative weight of seminal vesicles was reduced by 33, 63 and 88 % following oral, daily treatment with 10, 30 and 100 mg/kg of darolutamide, in comparison to the 3 mg/kg, s.c., daily TP-stimulated group	4.2.1.1.7 (R-9756) 4.2.2.2.7 (R-9976)
Anti-tumor efficacy in VCaP xenograft model	VCaP xenograft in castrated mice	Xenografted tumors were observed to grow significantly more slowly in mice treated for 37 days with 50 mg/kg of darolutamide, orally, once daily, compared to castrated untreated mice ($p < 0.01$). When treating mice twice daily with 50 mg/kg darolutamide for 37 days, tumor regression was observed ($p < 0.001$), compared to castrated untreated mice	4.2.1.1.10 (R-9762)
Anti-tumor efficacy in VCaP orthotopic model	VCaP orthotopic model in intact and castrated mice	In intact mice, orthotopic tumor growth inhibition was observed after 3 weeks of treatment with 50 mg/kg of darolutamide, orally, twice daily, as compared to vehicle controls.	4.2.1.1.8 (R-9760)
		In castrated mice, orthotopic tumor growth was decreased dose-dependently, with 100 mg/kg of darolutamide applied orally, twice daily, however the decrease was not statistically significant due to high intra-group variation	4.2.1.1.9 (R-9761)

2.6.3.3 副次的薬理試験

別途記載のない限り、すべての試験はOrion Corporation Orion Pharma（Turku、フィンランド）で行われた。

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Secondary Pharmacodynamics - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Report Number	Location in CTD
5-Hydroxytryptamin uptake assay	Rat brain synaptosomes	*In vitro*	R-9871 [a]	4.2.1.2.1
Radioligand binding and enzyme assays	Various	*In vitro*	R-9872 [a]	4.2.1.2.2
Radioligand binding and enzyme assays	Various	*In vitro*	R-9873 [a, b]	4.2.1.2.3
Radioligand binding and enzyme assays	Various	*In vitro*	R-9874 [a, c]	4.2.1.2.4
Whole-cell patch-clamp technique	Rat striatal neurons	*In vitro*	R-9875 [d]	4.2.1.2.5
Human progesterone receptor-transactivation assay	Stably transfected human U2-OS osteosarcoma cells	*In vitro*	R-9876 [d]	4.2.1.2.6

[a] external studies performed at Cerep, Celle L'Evescault, France
[b] study conducted with test item keto-darolutamide
[c] study conducted with test items (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide
[d] study conducted with test items darolutamide and keto-darolutamide

2.6.3.4 安全性薬理試験

別途記載のない限り、すべての試験はOrion Corporation Orion Pharma（Turku、フィンランド）で行われた。

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Safety Pharmacology - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD (Report Number)
Effects on hERG K^+ current	Stably transfected HEK293 cells	*In vitro* [a]		4.2.1.3.1 (R-9683)
Effects on L-type Ca^{2+} channel	human IMR-32 neuroblastoma cells	*In vitro* [a]		4.2.1.3.5 (R-9689)
Effects on central nervous system	Rat	Oral (gavage)	[redacted], UK	4.2.3.2.4 (R-9668)
Effects on respiratory system	Rat	Oral (gavage)	[redacted], UK	4.2.1.3.3 (R-9687)
Effects on gastrointestinal system	Rat	Oral (gavage)		4.2.1.3.4 (R-9688)
	Rat	Oral (gavage)		4.2.1.3.2 (R-9686)

[a] study conducted with test items darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide and keto-darolutamide

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Safety Pharmacology – Overview (continued)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD (Report Number)
Effects on cardiovascular system	Anesthetized dog	Intravenous	[redacted], France	4.2.1.3.7 (R-9691 / R-12429)
	Anesthetized dog	Intravenous [a]	[redacted], France	4.2.1.3.6 (R-9690 / R-12430)
	Dog	Oral (gavage)	[redacted], UK	4.2.3.2.8 (R-9667)
	Dog	Oral (gavage)	[redacted], France	4.2.3.2.9 (R-9672)
	Dog	Oral (gavage)	[redacted], France	4.2.3.2.10 (R-9679)

[a] study conducted with test item (*S*,*S*)-darolutamide

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Safety Pharmacology – *In vitro* studies

Organ Systems Evaluated	Test system	Concentration [µM]	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Electrophysiology					
hERG K^+ current [a]	Stably transfected HEK293 cells (2-6 cells/concentration)	0 (vehicle control: DMSO), 1, 3, 10, 30	Dose-dependent block of hERG current by all test items used; IC_{50}[darolutamide] = 87.9 µM IC_{50}[(*S*,*R*)-darolutamide] = 11.5 µM IC_{50}[(*S*,*S*)-darolutamide] = 30.2 µM IC_{50}[keto-darolutamide] = 8.0 µM	No	4.2.1.3.1 (R-9683)
		positive control E-4031: 0.1	92.1% inhibition		
L-type Ca^{++} channel [a]	human IMR-32 neuroblastoma cells	1, 3, 10, 30, 100	Dose-dependent inhibition of KCl induced Ca^{++} influx through L-type Ca^{++} channels by all test items used; IC_{50}[darolutamide] = 37.4 µM IC_{50}[(*S*,*R*)-darolutamide] = 42.5 µM IC_{50}[(*S*,*S*)-darolutamide] = 46.6 µM IC_{50}[keto-darolutamide] = 22.5 µM	No	4.2.1.3.5 (R-9689)
		reference antiandrogen: 1, 3, 10, 30, 100	IC_{50}[bicalutamide] = 12.9 µM		
		positive controls verapamil, nicardipine: 0.003, 0.03, 0.3, 3, 30	IC_{50}[verapamil] = 4.1 µM IC_{50}[nicardipine] = 0.6 µM		

[a] study conducted with test items darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide and keto-darolutamide

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Central nervous system							
Detailed clinical and functional observations, body temperature within a 28-day systemic toxicity study	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 (MC), 100, 300, 1000; once daily	male (10), female (10)	no acute effects ≥ 300 mg/kg: week 3 only: Slight trend for reduced motor activity in male and female animals	Yes	4.2.3.2.4 (R-9668)
Respiratory system							
Respiratory rate, tidal volume and respiratory minute volume	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 (MC), 100, 300, 1000	male (5)	No effects	Yes	4.2.1.3.3 (R-9687)
Gastrointestinal system							
Gastrointestinal motility and gastric emptying	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	solution: 0 (MPG), 30, 100	male (7 - 8)	≥ 30 mg/kg: Decreased intestinal transit; Inhibition of gastric emptying	No	4.2.1.3.4 (R-9688)
	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	suspension: 0 (MC), 30, 100, 300, 1000	male (8)	No effects	No	4.2.1.3.2 (R-9686)

[a] single dose unless specified otherwise
MC (vehicle): 0.5% (w/v) aqueous methylcellulose with 0.5% (v/v)Tween 80;
MPG (vehicle): 50% (v/v) macrogol, 30% (v/v) propylene glycol, and 20% (v/v) glucose 5% solution

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies (continued)

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Cardiovascular system							
Cardio-hemodynamics, ECG, blood gases incl. systemic exposure in anesthetized animals	Dog/ Beagle	4 consecutive, cumulative intravenous bolus injections every 30 minutes	0 (MPG), 3, 10, 20	male (4)	At ≥ 10 mg/kg: Vasodilation with decrease in arterial blood pressure; transient increase in mean coronary flow and transient increase in cardiac output (20 mg/kg) At 20 mg/kg: Slight and brief shortening in ventricular repolarization duration (QT and QTc interval) Plasma exposure levels at 2 min (C_{2min}) [ng/mL]: 9285 (low), 27250 (mid), 46275 (high dose)	Yes	4.2.1.3.7 (R-9691 / R-12429)

[a] single dose unless specified otherwise
MPG (vehicle): 50% (v/v) macrogol, 30% (v/v) propylene glycol, and 20% (v/v) glucose 5% solution

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies (continued)

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Cardiovascular system							
Cardio-hemodynamics, ECG, blood gases incl. systemic exposure in anesthetized animals	Dog/ Beagle	4 consecutive, cumulative intravenous bolus injections every 30 minutes	(*S*,*S*)-darolutamide 0 (MPG), 1, 3, 10	male (4)	At 1 mg/kg: Slight transient decrease in arterial blood pressure; At ≥ 3 mg/kg: Vasodilation with decrease in arterial blood pressure and slight shortening in ventricular repolarization duration (QT and QTc interval) At 10 mg/kg: Marked and transient increase in mean coronary flow; complete atrio-ventricular block in 1 out of 4 animals that was reversible Plasma exposure levels (*S*,*S*)-darolutamide at 2 min (C_{2min}) [ng/mL]: 4000 (low), 9280 (mid), 27200 (high dose)	Yes	4.2.1.3.6 (R-9690 / R-12430)

[a] single dose unless specified otherwise

MPG (vehicle): 50% (v/v) macrogol, 30% (v/v) propylene glycol, and 20% (v/v) glucose 5% solution

Test Article: **Darolutamide, BAY 1841788**

Safety Pharmacology – *In vivo* studies (continued)

Organ Systems Evaluated	Species /Strain	Method of Admin.	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Cardiovascular system							
Conventional ECG and arterial blood pressure recordings within a 28-day systemic toxicity study	Dog/ Beagle	Oral (gavage)	0 (MC), 50, 200, 800; once daily	male (4)	No effects	Yes	4.2.3.2.8 (R-9667)
ECG (by jacketed external telemetry) and conventional arterial blood pressure recordings within a 13-week systemic toxicity study	Dog/ Beagle	Oral (gavage)	0 (MC), 25, 75, 200; twice daily	male (4 - 6), female (4 - 6)	No effects	Yes	4.2.3.2.9 (R-9672)
Conventional ECG and arterial blood pressure recordings within a 39-week systemic toxicity study	Dog/ Beagle	Oral (gavage)	0 (MC), 25, 75, 200; twice daily	male (4 - 6), female (4 - 6)	No effects	Yes	4.2.3.2.10 (R-9679)

[a] single dose unless specified otherwise
MC (vehicle): 0.5% (w/v) aqueous methylcellulose with 0.5% (v/v) Tween 80

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。