2.6.4　薬物動態試験の概要文の目次

2.6.4.1　まとめ..... 3
2.6.4.2　分析法..... 6
2.6.4.2.1　被験物質及び投与製剤..... 6
2.6.4.2.2　[^{14}C]ダロルタミドの合成..... 6
2.6.4.2.3　放射能の測定..... 6
2.6.4.2.4　血漿中ダロルタミド及びM-1濃度の分析法..... 6
2.6.4.2.5　代謝プロファイル..... 8
2.6.4.2.6　薬物動態データの取扱い..... 8
2.6.4.3　吸収..... 9
2.6.4.3.1　単回投与後の薬物動態..... 9
2.6.4.3.2　反復投与後の薬物動態..... 20
2.6.4.4　分布..... 25
2.6.4.4.1　血漿タンパク結合と血球移行..... 25
2.6.4.4.2　臓器・組織分布..... 28
2.6.4.4.2.1　マウス..... 28
2.6.4.4.2.2　ラット..... 29
2.6.4.5　代謝..... 32
2.6.4.5.1　*In vitro*における代謝..... 34
2.6.4.5.1.1　動物種間の比較..... 34
2.6.4.5.1.1.1　代謝物の同定..... 34
2.6.4.5.1.1.2　SR体とSS体の相互変換..... 35
2.6.4.5.1.1.3　ダロルタミドの第Ⅰ相代謝酵素に対する基質特性..... 36
2.6.4.5.1.1.4　ダロルタミドのUGT分子種に対する基質特性..... 37
2.6.4.5.1.2　ダロルタミドのCYP分子種に対する阻害作用..... 38
2.6.4.5.1.3　ダロルタミドのUGT分子種に対する阻害作用..... 40
2.6.4.5.1.4　ダロルタミドのDPDに対する阻害作用..... 41
2.6.4.5.1.5　ダロルタミドのCYP分子種に対する誘導作用..... 41
2.6.4.5.2　*In vivo*における代謝..... 42
2.6.4.6　排泄..... 46
2.6.4.6.1　ラット..... 46
2.6.4.6.2　ヒト..... 47
2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用..... 47
2.6.4.8　その他の薬物動態試験..... 48
2.6.4.8.1　Caco-2細胞を用いたダロルタミドの膜透過性の検討..... 48

2.6.4.8.2　ダロルタミドの排出トランスポーターにおける基質特性 49
2.6.4.8.3　ダロルタミドの取り込みトランスポーターに対する基質特性..... 50
2.6.4.8.4　ダロルタミドの排出トランスポーターに対する阻害作用 50
2.6.4.8.5　ダロルタミドの取り込みトランスポーターに対する阻害作用..... 51
2.6.4.8.6　代謝物 M-1 に関する検討..... 52
2.6.4.8.6.1　M-1 の第 I 相代謝酵素に対する基質特性..... 52
2.6.4.8.6.2　M-1 の代謝に関わる UGT 分子種の同定..... 53
2.6.4.8.6.3　M-1 の CYP 分子種に対する阻害作用..... 53
2.6.4.8.6.4　M-1 の UGT 分子種に対する阻害作用..... 53
2.6.4.8.6.5　M-1 の DPD に対する阻害作用..... 54
2.6.4.8.6.6　M-1 の CYP 分子種に対する誘導作用..... 55
2.6.4.8.6.7　M-1 の排出トランスポーターに対する基質特性..... 56
2.6.4.8.6.8　M-1 の取り込みトランスポーターに対する基質特性..... 56
2.6.4.8.6.9　M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用..... 57
2.6.4.8.6.10　M-1 の取り込みトランスポーターに対する阻害作用..... 58
2.6.4.9　考察及び結論..... 59
2.6.4.10　図表..... 63
引用文献一覧 64

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　まとめ

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新規の非ステロイド系選択的アンドロゲン受容体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に開発されている。ダロルタミドは、(*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 2 種のジアステレオマーの等量混合物である。ダロルタミド単回投与後の薬物動態は、静脈内投与又は経口投与により雄性 Balb/c ヌードマウス、雄性 Wistar 系ラット及び雄性ビーグル犬にて評価した。主要な試験ではダロルタミドに加えて、SR 体及び SS 体個別の薬物動態についても検討した。更に、雄性ラットにおいては[^{14}C]ダロルタミドを単回静脈内投与及び経口投与したときの薬物動態を検討した。反復投与後の薬物動態は、雄性マウス及び雄性ラットにおける 6～7 日間の反復投与薬物動態試験成績、並びに雄性ラット及び雄性イヌにおける反復投与毒性試験で得られた曝露量に基づき評価した。*In vitro* 試験においては、ヒト及び動物における血漿タンパク結合、血球移行、代謝経路、膜透過性を検討し、ヒトにおける代謝の責任酵素を同定した。また、ヒトの主要な薬物トランスポーターに対する基質特性について検討した。相互作用薬としての薬物動態学的薬物相互作用の可能性については、CYP 誘導及び阻害作用、UGT 阻害作用、薬物トランスポーターに対する阻害作用に基づき評価した。

ヒト血漿中の主要代謝物ケト-ダロルタミド（以下、M-1）については、*in vitro* にて血漿タンパク結合、血球移行及び薬物相互作用の可能性を評価した。

薬物動態試験の一覧及び詳細は概要表 2.6.5 に示す。なお、イヌにおいては濃度依存的なタンパク結合が観察されたことから、みかけの薬物動態パラメータを示す。開発初期に使用した化合物番号の一覧は 2.6.1 を参照のこと。

ラット及びイヌにダロルタミドを単回静脈内投与したとき、ダロルタミドの全身クリアランス（CL）は低く、定常状態における分布容積（V_{ss}）は大きかった。薬理学的活性を有するヒト血漿中の主要代謝物 M-1 は、ダロルタミドの二級水酸基がケトンに酸化されたものである。この M-1 を経由して、ダロルタミドを構成する SR 体と SS 体は相互変換されるが、ヒトにおいては SS 体への変換が優勢であった。ヒト血漿中において、動物で曝露の確保されていない不均衡性代謝物は認められなかった。ダロルタミド血漿中濃度の終末相における消失半減期は、ラットで 4 時間、イヌでは 6.6 時間（みかけの消失半減期）であった。M-1 は、ラット、イヌ及びヒトでダロルタミドと並行して消失した。ダロルタミドを静脈内投与後の M-1 の終末相における消失半減期はラットで 3.5 時間、イヌでは 7.9 時間（みかけの消失半減期）であった。

ダロルタミドを反復経口投与したとき、定常状態において SR 体と SS 体の血漿中曝露量〔$AUC(0\text{-}t_{last})$〕の比は、ラットでほぼ 1：1 であった。イヌ及びマウスの血漿中では SR 体の割合が大きく、イヌでは約 9：1、マウスでは約 8：2 であった。ヒト血漿中では逆に SS 体の割合が大きく、ダロルタミドの曝露量のうち約 85%を占めた。

ダロルタミドを最長 28 日間まで反復経口投与後、血漿中 M-1 の AUC は、ラットでは親化合物の 1.2～1.4 倍、イヌでは 0.7 倍、ヒトでは最大で親化合物の約 2 倍であった。しかしながら、M-1 の非結合型分率は親化合物よりも極めて低いことから、非結合型濃度に基づくと M-1 の AUC は親化合物よりもかなり低かった。

反復投与毒性試験において、雄性ラットにダロルタミド 100、300 及び 1000mg/kg を懸濁液として経口投与したとき、全身曝露量（C_{max} 及び AUC）の増加は用量比を下回った。雄性ラットにダロルタミド 10 及び 100mg/kg を溶液として単回経口投与したとき、バイオアベイラビリティは

高く、ほぼ 100%であった。反復投与毒性試験において、雄性イヌにダロルタミド 50、200 及び 800mg/kg を懸濁液として経口投与したとき、全身曝露量の増加はみかけの AUC 及び C_{max} のいずれも用量比を下回った。100mg/kg の単回投与では、食餌により経口吸収は増加し、全身曝露量 AUC(0-28)は絶食下投与に比べてやや高値であった。しかしながら、絶食下及び非絶食下でのバイオアベイラビリティは低く、それぞれ 12.6%及び 16.3%であった。

ダロルタミドの血漿タンパク結合率はイヌを除く動物において中等度であり、非結合型分率はヒトで 8.0%、ラットで 5.4%、マウスで 4.7%であった。これらの動物では、非結合型分率は濃度に依存しなかった。一方、イヌでは血漿タンパク結合率は高く、低濃度での非結合型分率は 1%未満であったが、高濃度では結合の飽和が認められ、最大で 8.4%に増加した。ヒト血漿における主要な結合タンパク種はアルブミンであった。M-1 の血漿中における非結合型分率は、すべての動物で 1%未満と低かったが、イヌでは親化合物と同様に結合の飽和が認められた。タンパク結合の濃度依存的な飽和はイヌで特異的に認められたが、毒性試験における高い血漿中濃度では、イヌを含めてすべての動物におけるタンパク結合率は同程度であり、ヒトとの全身曝露の比較において問題にならないと考えられた。

雄性マウス及び雄性ラットにおける臓器・組織分布試験において、排泄臓器及び脳における分布は、両動物種において同様であった。マウスにおいてダロルタミド及び M-1 の脳内への移行はごくわずかであった。組織中濃度の AUC(0-t_{last})が血漿中濃度の AUC(0-t_{last})に対して最も高かったのは、排泄臓器である肝臓及び腎臓であった。ラットの定量的全身オートラジオグラフィにおいては、[^{14}C]ダロルタミドを経口投与後、放射能は血中から組織・臓器に広範にかつ均一に分布した。マウスと同様、ラットにおいても脳内に分布した放射能はごくわずかであった。消化管粘膜及び内容物の放射能濃度は高かった。放射能のメラニン含有組織への分布がわずかに認められたが、放射能の不可逆的な結合又は残留を示す所見は認められなかった。投与 168 時間後のラット体内に残存する放射能は投与量の 1%未満に過ぎなかった。

[^{14}C]ダロルタミドを経口投与後、ラット及びヒト血漿中放射能の主要な構成成分はダロルタミド及び M-1 のみであった。ダロルタミドはラット血漿中において総放射能 AUC の 50%を占めたが、ヒトでは 29%であった。M-1 は、ラットでは総放射能 AUC の 49%、ヒトでは 59%を占めたが、M-1 の非結合型分率はかなり低く、特にヒトではダロルタミドの 40 分の 1 に過ぎないことから薬理作用の主体はダロルタミドと考えられた。

[^{14}C]ダロルタミドをラットに静脈内及び経口投与したとき、放射能は主に胆汁／糞を介する経路で排泄された。投与 168 時間までに、胆汁／糞及び尿中に最大でそれぞれ投与量の 64%及び 33%に相当する放射能が回収され、ラット体内の残存量は 1%未満であった。親化合物として糞及び尿中にそれぞれ投与量の約 42%及び約 3%が排泄された。胆管カニュレーションを施した（BDC）ラットの胆汁中には、投与 24 時間以内に投与量の約 53%（静脈内投与）及び 44%（経口投与）に相当する放射能が排泄された。静脈内投与 24 時間以内に BDC ラットの消化管内又は糞中に認められた親化合物は投与量の約 20%に相当したが、これは胆汁外排泄（消化管分泌）によるものであった。ヒトに経口投与後、放射能は主に尿中に排泄され、尿中には投与量の 63%相当、糞便中には投与量の 32%相当が回収された。投与量の約 3 分の 1 は親化合物として糞便（30%）及び尿中（7%）に排泄されたが、これらは部分的にはグルクロン酸抱合体の脱抱合により生じた可能性がある。更に、投与量の別の約 3 分の 1 はグルクロン酸抱合体として尿中に排泄され、残る約 3 分の 1 は酸化的代謝物として消失した。血漿中の主要な代謝物である M-1 は糞便中にわずかに検出されたのみであった（1%未満）。ラット及びヒトの代謝経路は同様であり、ヒトでは放射能は主に尿中に排泄された。ラット及びヒトでは 3 種類の消失経路（親化合物の直接排泄、グルクロン酸抱合、酸化的代謝）が同定された。ラットではグルクロン酸抱合体はあまり多くなく（5%未満）、酸化的代謝（約 50%）及び親化合物の排泄（44%）が多かったが、ヒトではこの 3 種類の経路の割合は同程度であった。

種々動物の肝細胞を用いた *in vitro* 試験において、ヒト、ラット及びイヌ肝細胞では代謝物として M-1 が最も多く産生された。ヒト肝細胞では、*O*-グルクロン酸抱合体 M-7 及び他の数種類のグルクロン酸抱合体及び水酸化代謝物が少量産生された。ヒトの主要な代謝経路はラット及びイヌ肝細胞でもおおむね共通して認められた。

ダロルタミドの酸化的代謝、特に M-1 の産生は、主にチトクローム P450（CYP）3A4 により触媒された。ダロルタミドのグルクロン酸抱合は数種類のウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）分子種、主に UGT1A9、次いで UGT1A1、UGT1A3 及び UGT2B10 により触媒された。マウス、ラット、サル、イヌ、ミニブタ及びヒトの肝細胞を用いた *in vitro* 試験において、SR 体及び SS 体は M-1 を介して相互変換され、M-1 からダロルタミドへの還元はヒトでは主にアルドケト還元酵素（AKR）1C3 により触媒された。相互変換の程度については種差がみられた。ヒト肝細胞では、M-1 から速やかに親化合物に還元されたが、主に SS 体が産生された。

In vitro 試験において、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 は、主要な CYP 及び UGT 分子種、また、ジヒドロピリミジン脱水素酵素（DPD）の酵素活性に顕著な影響を示さなかった。最も強い阻害作用は CYP2C9 及び UGT1A1 に対する M-1 において認められ、CYP2C9 に対する IC_{50} 値は 9.6μM 及び UGT1A1 に対する IC_{50} 値は 6.4μM であった。ヒトの薬物動態パラメータに基づく静的薬物速度論モデルを用いると、ダロルタミドの投与により代謝酵素の阻害作用を介して臨床的に問題となる薬物動態学的相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 は *in vitro* にて最高濃度 10000μg/L まで CYP1A2 及び CYP2B6 の誘導作用を示さなかったが、CYP3A4 の mRNA レベル及び酵素活性を濃度依存的に誘導した（最大 13 倍）。実際に、CYP3A4 により影響を受けやすい基質ミダゾラムを用いた臨床薬物相互作用試験では、ダロルタミドは弱い誘導薬（ミダゾラムの AUC は 29%低下）であった。

ダロルタミドはヒト消化管での予測最高濃度において、膜透過性の高い化合物に分類された。ダロルタミド及び M-1 は *in vitro* で P-gp 及び BCRP の基質であったが、高い膜透過性を考慮すると、P-gp 及び BCRP の阻害薬を併用してもダロルタミドの曝露量に対して臨床的に問題となる影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。これは P-gp 及び CYP3A4 の阻害薬であるイトラコナゾールを用いた臨床薬物相互作用試験で確認された。なお、SR 体及び SS 体の膜透過性に明らかな差異はなかった。

ダロルタミド及び M-1 は取り込みトランスポーターである OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質ではなかった。ダロルタミドは複数のトランスポーターに対して阻害作用を示し、阻害作用の強い順に BCRP、OAT3、MATE2K、P-gp、OATP1B1、MATE1 及び OATP1B3 に対する IC_{50} 値は 1.3μM、4.5μM、9.5μM、16.4μM、16.8μM、32.3μM 及び 39.3μM であった。更に、M-1 は BCRP、P-gp、及び MATE2K に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 0.6μM、2.6μM 及び 3.0μM であった。ダロルタミド及び M-1 のいずれも MRP2、BSEP、OAT1、OCT1、OCT2、OATP2B1、NTCP に対しては阻害作用を示さなかった。

ダロルタミドの消化管における BCRP 阻害によって、臨床的に問題となる相互作用が予測された。実際に BCRP 基質ロスバスタチンを用いた臨床薬物相互作用試験において、ダロルタミドの併用によりロスバスタチンの AUC は約 5 倍に上昇した。一方、P-gp 基質としてダビガトランエテキシラートを用いた臨床薬物相互作用試験では、全身曝露量に対する明確な影響は認められず、ダロルタミドによる P-gp 阻害（*in vitro* での IC_{50} 値 16.4μM）の臨床的意義は低いことが示唆された。

OAT3、OATP 及び MATE 阻害により、臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

2.6.4.2　分析法

2.6.4.2.1　被験物質及び投与製剤

ダロルタミドの用量及び濃度は、特に記載のない限り薬理学的活性成分としての 2 種のジアステレオマー、すなわち SR 体及び SS 体の和を示す。投与に用いたダロルタミドは SR 体及び SS 体の等量混合物である。ダロルタミドの分子量は 398.85（1μM＝398.85μg/L）、*in vitro* 試験で用いた主要代謝物 M-1 の分子量は 396.83（1μM＝396.83μg/L）である。

2.6.4.2.2　[^{14}C]ダロルタミドの合成

参照項目：4.2.2.1.1　R-11019
4.2.2.1.3　PH-39708
4.2.2.5.1　R-9663

[^{14}C]ダロルタミドの合成は 2 回行った。いずれの合成においても[^{14}C][redacted]を用いてダロルタミドのフェニル基に[^{14}C]シアノ標識を導入した。ダロルタミドの[redacted]に[^{14}C]を導入後、ケトン基を還元することにより[^{14}C]ダロルタミドを得た。1 回目の合成（4.2.2.1.1 R-11019）での全収率は 13％、得られた標識体の比放射能は 2.3MBq/mg、2 回目の合成（4.2.2.1.3　PH-39708）での全収率は 13%、得られた標識体の比放射能は 2.65MBq/mg であった。

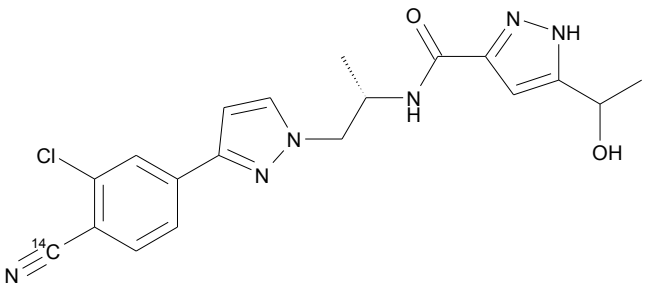


図 2.6.4.2- 1　[^{14}C]ダロルタミドの化学構造式及び標識位置

ラットに[^{14}C]ダロルタミドを静脈内投与したとき、48 時間後までの呼気中に $^{14}CO_2$ は認められず、標識位置は代謝的に安定であることが示された（4.2.2.5.1　R-9663）。

2.6.4.2.3　放射能の測定

体液、臓器・組織及び排泄物は、適切な前処理を施した後、液体シンチレーション計数法（LSC）にて総放射能を測定した。この方法では未変化体及び放射性代謝物を分別測定することはできない。

2.6.4.2.4　血漿中ダロルタミド及び M-1 濃度の分析法

参照項目：4.2.2.1.4　R-9746
4.2.2.1.5　R-9912
4.2.2.1.6　R-9977

非臨床試験の生体試料中薬物濃度測定のために、2 種類の液体クロマトグラフィタンデム質量分析（LC-MS/MS）法を確立し、バリデーションを行った。1 つはジアステレオマーを分離せずにダロルタミド及び M-1 を測定する方法、もう 1 つはジアステレオマー分離を行い SR 体、SS 体及

び M-1 を測定する方法である。これらの方法では、それぞれアキラル及びキラルカラムを接続した LC-MS/MS を使用し、検量線は ^{13}C 標識の内標準物質を用いて重みつき線形回帰により作成した。

分析法バリデーション及び実試料の分析は、適切なガイドラインに従って実施した[1,2]。ダロルタミドに関連する分析対象物質のヒト及び動物の血漿試料における分析単位内の真度及び精度を表 2.6.4.2- 1 に示す。

ジアステレオマーを分離しない方法での定量範囲は、すべての動物の血漿でダロルタミドは 2～500ng/mL、M-1 は 50～12500ng/mL であった。ジアステレオマーを分離する場合の定量範囲は、ラット及びイヌ血漿中ではすべての分析対象物質で 10～2500ng/mL であった。LLOQ での分析単位内及び分析単位間の精度は 20%以内、同じく真度は 80%～120%、LLOQ 以外の濃度での分析単位内及び分析単位間の精度は 15%以内、同じく真度は 85%～115%であり、社内 SOP 及びガイドラインで求められる範囲内であった（分析単位間の精度及び真度はジアステレオマーを分離する方法のみで評価した）。

表 2.6.4.2- 1　ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の分析法バリデーション（分析単位内の真度及び精度）

Matrix	**Report**	**Darolutamide**		
		Range (ng/mL)	**intra-assay accuracy (%)**	**intra-assay precision (%)**
Mouse Plasma	R-9977	2.00 – 500	99.5 – 110.0	1.5 – 5.5
Rat Plasma	R-9912	n.a.	n.a.	n.a.
Dog Plasma	R-9912	n.a.	n.a.	n.a.
Human Plasma	R-9977	2.00 – 500	96.6 – 110.3	3.2 – 11.4
Matrix	**Report**	**Keto-darolutamide**		
		Range (ng/mL)	**intra-assay accuracy (%)**	**intra-assay precision (%)**
Mouse Plasma	R-9977	50.0 – 12500	100.0 – 108.8	3.2 – 9.4
Rat Plasma	R-9912	10.0 – 2500	91.5 – 105.0	0.6 – 3.8
Rat Plasma	R-9746	10.0 – 2500	103.2 – 110.0	1.5 – 5.1
Dog Plasma	R-9912	10.0 – 2500	89.5 – 104.5	1.6 – 8.4
Dog Plasma	R-9746	10.0 – 2500	96.8 – 112.0	1.7 – 11.7
Human Plasma	R-9977	50.0 – 12500	97.7 – 108.0	4.8 – 15.0
Matrix	**Report**	**(*S*,*R*)-darolutamide**		
		Range (ng/mL)	**intra-assay accuracy (%)**	**intra-assay precision (%)**
Rat Plasma	R-9912	10.0 – 2500	91.4 – 105.3	0.6 – 4.0
Rat Plasma	R-9746	10.0 – 2500	101.5 – 107.6	2.4 – 5.2
Dog Plasma	R-9912	10.0 – 2500	91.4 – 96.5	0.9 – 7.4
Dog Plasma	R-9746	10.0 – 2500	98.8 – 107.6	1.5 – 11.8
Matrix	**Report**	**(*S*,*S*)-darolutamide**		
		Range (ng/mL)	**intra-assay accuracy (%)**	**intra-assay precision (%)**
Rat Plasma	R-9912	10.0 – 2500	90.0 – 105.1	0.7 – 4.4
Rat Plasma	R-9746	10.0 – 2500	102.4 – 110.9	2.6 – 6.2
Dog Plasma	R-9912	10.0 – 2500	91.6 – 96.5	1.3 – 8.5
Dog Plasma	R-9746	10.0 – 2500	98.8 – 107.9	1.6 – 9.6

Data in mouse (Balb/c), rat (Wistar or Sprague-Dawley) and dog (beagle) plasma are shown.
n.a. = not applicable (see chiral assay performance summary)
Source: 4.2.2.1.4 R-9746, 4.2.2.1.5 R-9912, 4.2.2.1.6 R-9977

これらの方法を使用した非臨床試験を 2.6.5.2　Table 2-4 に示す。

加えて、マウスを用いた初期の試験では、LC-MS/MS 法を用いてマウス血漿及び組織中濃度の測定を行った（4.2.2.2.5　R-9919 及び 4.2.2.2.4　R-9723）。

ダロルタミド及び関連する分析対象物質は、室温放置及び凍結保存の血漿中において、すなわち試料採取から保存、分析に供するまでの取扱いに関する種々条件下で安定であることが示された。血漿中での保存安定性の結果を表 2.6.4.2- 2 に示す。

表 2.6.4.2- 2　ダロルタミド及び関連物質の安定性

Matrix	Report	Room temperature	LTS[a] (-20°C)	LTS[a] (-80°C)
Mouse Plasma	R-9977	n.a.	n.a.	48 days
Rat Plasma	R-9746, R-9912	24 hours[b]	42 days[b]	82 days
Dog Plasma	R-9746, R-9912	24 hours[b]	36 days[b]	75 days

a = LTS = long term stability
b = value from 4.2.2.1.5 R-9912
n.a. = not applicable

2.6.4.2.5　代謝プロファイル

代謝プロファイルは、キラルカラム又は一部の分析においてはアキラルカラムを接続した HPLC を用いて検討した。10mM ギ酸アンモニウム緩衝液／アセトニトリル又は 0.1%ギ酸／アセトニトリルの濃度勾配によって溶出し、放射能はオフラインで検出した。構造解明には LC-MS/MS を用いた。試料をそのまま、又は前処理後 HPLC にて分離した溶出液として MS インターフェースに導入した。代謝物の構造は、高分解能質量分析計（HRMS）による質量及び MS/MS フラグメントパターンの合成標品との比較、又は単離した後 NMR により推定した。

2.6.4.2.6　薬物動態データの取扱い

In vivo 及び *in vitro* 試験では、ダロルタミド、SR 体、SS 体、M-1、[^{14}C]ダロルタミド及び[^{14}C]ケト-ダロルタミド（[^{14}C]M-1）を使用した。放射性標識体を用いた試験では、総放射能、SR 体、SS 体、ダロルタミド（SR 体及び SS 体の和）及び放射性標識代謝物の濃度は[^{14}C]ダロルタミド当量として示した。

ダロルタミド濃度推移の薬物動態学的評価は、時間ごとの SR 体及び SS 体濃度の和を用いて、ノンコンパートメント（モーメント）解析又はコンパートメント解析で行ったが、いずれの方法で得られた薬物動態学的パラメータも、非臨床薬物動態の評価及びヒトとの比較に適切である。

薬物動態学的パラメータ及び濃度は、幾何又は算術平均値及び標準偏差により示した。平均値の算出方法は異なるが、薬物動態の評価及びヒトを含む動物との比較は可能である。一方、血漿タンパク結合、排泄及び回収に関わるデータはすべて算術平均値及び標準偏差で示した。

2.6.4.3　吸収

ヌード Balb/c マウス（CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl）、Wistar 系ラット及びビーグル犬を用いて、主に臨床投与経路である経口投与後の血漿中ダロルタミド濃度について検討した。マウス及びラットは効力薬理試験（2.6.2.2）で使用し、ラット及びイヌは安全性薬理試験（2.6.2.4）及び毒性試験（2.6.6）で使用した動物種である。臨床ではダロルタミドは 1 日 2 回経口投与される。そのため、非臨床薬物動態の検討では、ダロルタミドを 1 日 1 回又は 1 日 2 回経口投与した。ダロルタミド（SR 体と SS 体の等量混合物）投与後の血漿中濃度はほとんどの場合、ジアステレオマーそれぞれを分別定量した。また、すべての非臨床薬物動態試験、トキシコキネティクス及び臨床薬物動態試験において、ヒト血漿中の主要な代謝物 M-1 の濃度を測定した。M-1 はダロルタミド（及び各ジアステレオマー）と同様の薬理活性を有する。

2.6.4.3.1　単回投与後の薬物動態

参照項目：
4.2.2.2.1　PH-40003
4.2.2.5.1　R-9663
4.2.2.2.6　R-9881
4.2.2.2.3　R-9733
4.2.2.2.2　R-9661

雄性ラット及び雄性イヌにおける単回投与薬物動態試験の概要をそれぞれ表 2.6.4.3- 1 及び表 2.6.4.3- 2 に、その結果を表 2.6.4.3- 3～表 2.6.4.3- 14、図 2.6.4.3- 1～図 2.6.4.3- 3 にそれぞれ示す。イヌにおいては濃度依存的な血漿タンパク結合のため（表 2.6.4.4- 3 及び表 2.6.4.4- 4）、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 のすべてにおいて非線形の薬物動態を示した。したがって、イヌにおいては、みかけの薬物動態パラメータを示した。

<u>静脈内投与</u>

雄性ラット及び雄性イヌにダロルタミドをそれぞれ 10mg/kg 及び 3mg/kg（実投与量 2.7mg/kg）の用量で単回急速静脈内投与したときのダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の血漿中濃度推移を図 2.6.4.3- 2 及び図 2.6.4.3- 3 に、薬物動態パラメータを表 2.6.4.3- 3 及び表 2.6.4.3- 8 にそれぞれ示す。ラットにおけるダロルタミドの全身クリアランス（CL）及びイヌにおけるみかけの CL は低く、ラットでは 0.46L/(h･kg)、イヌでは 0.19L/(h･kg)であった。ラットにおける SR 体及び SS 体の CL は同程度で、それぞれ 0.41 及び 0.53L/(h･kg)であったが、イヌでは SR 体のみかけの CL は 0.11L/(h･kg)と、SS 体の 0.70L/(h･kg)に比べてかなり低かった。ラットにおける定常状態の分布容積（V_{ss}）は、ダロルタミド、SR 体及び SS 体のそれぞれで 1.16、0.867 及び 1.61L/kg と中等度～大きく、イヌにおけるみかけの V_{ss} は 1.42、0.89 及び 2.61L/kg と大きかった。

ラットにダロルタミドを静脈内投与したときの SR 体及び SS 体の C_{max} 及び AUC はほぼ同等（AUC 比、RS 体：SS 体＝56：44、表 2.6.4.3- 3）であったが、イヌでは SR 体の方が優勢（同＝85：15、表 2.6.4.3- 8、図 2.6.4.3- 3）であった。ラットにおけるダロルタミド及び SR 体と SS 体の血漿中濃度の消失半減期は約 4 時間であった。イヌでは SS 体の消失半減期は 4.5 時間であり、SR 体及びダロルタミドのそれぞれ 6.8 時間及び 6.6 時間と比べて消失は速やかであった。

ラット及びイヌにおいて M-1 とダロルタミドの AUC の比は 1：1 であった。ダロルタミド静脈内投与後の血漿中 M-1 濃度の消失半減期は、ラットでは 3.5 時間、イヌでは 7.9 時間であった。

イヌに SR 体及び SS 体を 3mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの薬物動態パラメータをそれぞれ表 2.6.4.3- 9 及び表 2.6.4.3- 10 に示す。SR 体のみかけの CL は 0.062L/(h･kg)、SS 体

は 0.85L/(h･kg)であり、いずれもダロルタミドとして 2.7mg/kg を静脈内投与後の SR 体及び SS 体のみかけの CL と同様であった（表 2.6.4.3- 8）。消失半減期も SS 体及び SR 体でそれぞれ 4.5 時間及び 11 時間であり、ダロルタミド投与後の SR 体及び SS 体の半減期と同様であった。SR 体投与後の AUC(0-24)における SR 体と SS 体の比は 99：1、SS 体投与後では SR 体と SS 体の比は 18：82 であった。M-1 の産生は SS 体投与時に SR 体投与時と比較して高く、M-1 の AUC(0-24)は SS 体投与時の方が SR 体投与時の約 3 倍高かった。

経口投与

雄性ラットに[^{14}C]ダロルタミドを 10mg/kg（実投与量 10.85mg/kg）の用量で単回経口投与したときのダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の血漿中濃度推移を図 2.6.4.3- 2 に、総放射能濃度を含む薬物動態パラメータを表 2.6.4.3- 4 に示す。ダロルタミドは速やかに吸収され、投与 1 時間後（最高濃度到達時間：t_{max}）に C_{max} の 5880ng/mL に到達した。ラット血漿中濃度における AUC(0-24)の SR 体と SS 体との比は 53：47 であり、静脈内投与の場合（表 2.6.4.3- 3）と極めて類似していた。主要な代謝物 M-1 はダロルタミド投与後速やかに産生され、投与後 2 時間（t_{max}）に C_{max} の 3590ng/mL に到達した。M-1 の AUC(0-24)における親化合物に対する比は 0.73 であった。経口投与後と静脈内投与後の放射能の尿中排泄率の比較に基づくと、ダロルタミドの吸収率は 94%であり、ほぼすべてが吸収されたと考えられた（表 2.6.4.6- 1）。ラットにダロルタミドを 10mg/kg の用量で経口投与したときのバイオアベイラビリティは高く、ほぼ 100%であった（表 2.6.4.3- 4）。100mg/kg を経口投与したときのバイオアベイラビリティは 10mg/kg 投与時と比べてやや高かった（表 2.6.4.3- 5）。これは 10mg/kg 投与は絶食下で行い、100mg/kg 投与では摂餌下で行ったためと考えられた。100mg/kg 投与時においても SR 体と SS 体の AUC(0-24)比は 1:1 であった（表 2.6.4.3- 5）。ラットに SR 体又は SS 体を 50mg/kg の用量で経口投与したときの AUC(0-24)における SR 体と SS 体との比はそれぞれ 76：24（表 2.6.4.3- 6）及び 7：93（表 2.6.4.3- 7）であり、いずれのジアステレオマー投与においても *in vivo* で相互変換が生じる可能性が示された。雄性ラットの 4 週間反復投与毒性試験の初回投与において、ダロルタミドの全身曝露量の増加は 100mg/kg から 1000mg/kg までの間で用量比を下回ったことから、高用量の場合には消化管内での懸濁液からの低い溶解性によって、吸収が制限されたことが示唆された（表 2.6.4.3- 22）。

ラットに[^{14}C]ダロルタミドを 10mg/kg の用量で経口投与後、血漿中ダロルタミド濃度の消失半減期は 3.3 時間（表 2.6.4.3- 4）であり、静脈内投与後の 4 時間（表 2.6.4.3- 3）と同程度であった。

イヌにカプセル充填したダロルタミドを約 25mg/kg（300mg/body）の用量で単回経口投与したとき、投与 24 時間後までのデータで算出したみかけの消失半減期は 17 時間と推定された（表 2.6.4.3- 12 及び図 2.6.4.3- 3）。AUC(0-24)における SR 体と SS 体との比は 90：10 であった。バイオアベイラビリティは 41%であった。イヌにダロルタミドを水性懸濁液として 100mg/kg の用量で非絶食下及び絶食下で単回経口投与したとき、28 時間後までのデータで算出したみかけの消失半減期はそれぞれ 7 及び 11 時間であった。水性懸濁液における吸収は、特に絶食下で緩慢であった（表 2.6.4.3- 11）。摂餌によって吸収は増加し、非絶食下の AUC(0-28)は絶食下と比してやや高値であった。しかしながら、高用量におけるバイオアベイラビリティは摂餌条件によらず低く、絶食下で 12.6%、非絶食下で 16.3%であった（表 2.6.4.3- 11）。雄性イヌを用いた 4 週間反復投与毒性試験において、初回投与時の全身曝露量の増加は 50mg/kg から 800mg/kg までの間で用量比を下回ったことから、高用量の経口投与では非絶食下においても懸濁液からの低い溶解性によって吸収が制限されることが示唆された。

イヌにダロルタミド、SR 体又は SS 体 300mg を充填したカプセルを非絶食下で経口投与（～25mg/kg）したとき、投与したダロルタミド、SR 体及び SS 体の t_{max} は 0.25～12 時間の間で大きなばらつきを示した（表 2.6.4.3- 12、表 2.6.4.3- 13、表 2.6.4.3- 14）。これは、非絶食下

で投与された動物個々の胃及び消化管内容物の排出及び通過時間の差異によるものと考えられた。AUC(0-24)における SR 体と SS 体の比は、ダロルタミド投与時では 90：10、SR 体投与時では 99：1、SS 体投与時では 19：81 であった。ラットの場合と同様にイヌにおいても *in vivo* でのジアステレオマーの相互変換の可能性が示唆された。M-1 についても、投与物質の吸収パターンに依存して t_{max} は 1.5～12 時間とばらついた。M-1 の AUC(0-24)における親化合物に対する比はダロルタミド投与時で 0.63、SR 体投与時で 0.26、SS 体投与時で 4.41 であった（表 2.6.4.3-12、表 2.6.4.3- 13、表 2.6.4.3- 14）。

表 2.6.4.3- 1　ラット単回投与試験の概要

Study type	Single dose pharmacokinetics, *in vivo* study
Bayer reference	4.2.2.2.1 PH-40003, 2.6.5.3 Table 3-1
Test system	Intact rats (fasted), 4 males, strain: Wistar
Dosage	Darolutamide　: 10 mg/kg iv
Vehicle/	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Vol. of administration	1 mL/kg, bolus injection
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples
Bayer reference	4.2.2.5.1 R-9663, 2.6.5.3 Table 3-2
Test system	Intact rats (fasted), 16 males (2 males / time point), strain: Wistar
Dosage	[^{14}C]darolutamide[a]: Target dose: 10 mg/kg po (actual: 10.85 mg/kg)
Vehicle/	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Vol. of administration	1 mL/kg, gastric gavage
Assay, matrix	LSC, LC-MS/MS, plasma samples
Bayer reference	4.2.2.2.6 R-9881, 2.6.5.4 Table 4-23, Table 4-25, Table 4-27 (6 day study)
Test system	Intact rats (fed), 8 males / dose group, strain: Wistar
Dosage	Darolutamide:　100 mg/kg qd po (*S*,*R*)-darolutamide:50 mg/kg qd po (*S*,*S*)-darolutamide: 50 mg/kg qd po
Vehicle/	65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)
Vol. of administration	4 mL/kg, gastric gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples

a = specific activity: 3.33 MBq/mg

表 2.6.4.3- 2 イヌ単回投与試験の概要

Study type	Single dose pharmacokinetics, *in vivo* study
Bayer reference	4.2.2.2.3 R-9733, 2.6.5.3 Table 3-5 to Table 3-9
Test system	Dogs (fed), 2-4 males/dose group, strain: Beagle
Dosage	(*S*,*R*)-darolutamide : 3 mg/kg iv (*S*,*S*)-darolutamide : 3 mg/kg iv (*S*,*R*)-darolutamide : 300 mg per animal po (~25 mg/kg) (*S*,*S*)-darolutamide : 300 mg per animal po (~25 mg/kg) Darolutamide : 300 mg per animal po (~25 mg/kg)
Vehicle/ Vol. of administration	iv administration : 40% PEG400, 20% propyleneglycol, 40% glucose solution (5%) (v/v/v) 0.5 mL/kg, bolus injection po administration : substance weight into gelatin capsules gelatin capsules
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples
Bayer reference	4.2.2.2.2 R-9661, 2.6.5.3 Table 3-3 to Table 3-4
Test system	Dogs, 2 males/dose group, strain: Beagle
Dosage	Darolutamide : target: 3 mg/kg iv (actual: 2.7 mg/kg iv) 100 mg/kg po, food 30 min before dosing (fed) 100 mg/kg po, food 4 h after dosing (fasted)
Vehicle/ Vol. of administration	iv administration : 50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v) 0.5 mL/kg, bolus injection po administration : 0.5% methylcellulose + 0.5% Tween 80 suspension 5 mL/kg, gastric gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples

表 2.6.4.3- 3 ラットにダロルタミドを 10mg/kg の用量で絶食下単回静脈内投与後のダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ（4 例の幾何平均値）

		10 mg/kg darolutamide			
Analyte		**Darolutamide[a]**	**(*S*,*R*)-darolutamide[b]**	**(*S*,*S*)-darolutamide[b]**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	21600	12200	9410	21300
AUC_{norm}	[kg·h/L]	2.16	2.43	1.88	2.15
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	21600	12100	9360	21300
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	2.16	2.43	1.87	2.14
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	17800	10100	7690	7090
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.78	2.03	1.54	0.713
t_{max}[c]	[h]	0.0333	0.0333	0.0333	0.250
$t_{1/2}$	[h]	4.01	3.95	4.05	3.45
Range[d]	[h]	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0
MRT	[h]	2.51	2.11	3.02	2.81
CL	[L/(h·kg)]	0.462	0.411	0.531	n.c.
V_{ss}	[L/kg]	1.16	0.867	1.61	n.c.
MR[e]		n.a.	0.56	0.44	0.99

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = dose of 5 mg/kg used for the diastereomers each for PK evaluation
c = median
d = regression range shown instead of geometric mean
e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.c. = not calculated n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.2.1 PH-40003 2.6.5.3. Table 3-1

表 2.6.4.3- 4 ラットに[^{14}C]ダロルタミドを 10mg/kg の用量で絶食下単回経口投与後の総放射能、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ

		10 mg/kg [^{14}C]darolutamide[a]				
Analyte		**Total radio-activity[b]**	**Daro-lutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	71900	27200	14500	12700	20000
AUC_{norm}	[kg·h/L]	6.63	2.51	2.67	2.34	1.84
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	71300	27100	14400	12700	19900
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	6.57	2.50	2.65	2.34	1.83
t_{last}	[h]	24	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	15500	5880	3750	2130	3590
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.43	0.541	0.691	0.392	0.331
t_{max}	[h]	1	1	1	1	2
$t_{1/2}$	[h]	4.04	3.28	3.29	3.28	3.79
Range[c]	[h]	12-24	12-24	12-24	12-24	12-24
F[d]	[%]	n.a.	116	n.a.	n.a.	n.a.
MR[e]		n.a.	n.a.	0.53	0.47	0.73

a = actual dose = 10.85 mg/kg, dose-normalization was carried out with respect to the actual dose; 5.425 mg/kg used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters
b = Data in ng equivalent/mL was used for total radioactivity analysis.
c = regression range shown instead of geometric mean
d = calculated by $AUC(0\text{-}t_{last})$, iv values taken from 4.2.2.2.1 PH-40003
e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.5.1 R-9663 2.6.5.3 Table 3-2

表 2.6.4.3- 5 ラットにダロルタミドを 100mg/kg の用量で非絶食下 1 日 1 回反復経口投与したときの投与初日におけるダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ

		100 mg/kg darolutamide			
Analyte		**Darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	325000	161000	n.c.	335000
AUC_{norm}	[kg·h/L]	3.25	3.22	n.c.	3.35
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	312000	156000	156000	317000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	3.12	3.12	3.12	3.17
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	21100	14600	10400	23000
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.211	0.292	0.208	0.230
t_{max}	[h]	0.50	0.50	8.0	3.0
$t_{1/2}$	[h]	5.13	4.60	n.c.	5.69
Range[a]	[h]	5-24	5-24	n.c.	5-24
F[b]	[%]	144	n.a.	n.a.	n.a.
MR[c]		n.a.	0.50	0.50	1.0

a = regression range shown instead of geometric mean
b = calculated by $AUC(0\text{-}t_{last})$, iv values taken from 4.2.2.2.1 PH-40003
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.c. = not calculated n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.2.6 R-9881 2.6.5.4 Table 4-23

表 2.6.4.3- 6 ラットに SR 体を 50mg/kg の用量で非絶食下 1 日 1 回反復経口投与したときの投与初日におけるダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ

		50 mg/kg (*S*,*R*)-darolutamide			
Analyte		**Darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	n.c.	258000	n.c.	n.c.
AUC_{norm}	[kg·h/L]	n.c.	5.16	n.c.	n.c.
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	337000	256000	81200	170000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	6.74	5.12	n.c.	3.40
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	23600	18200	6400	12400
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.472	0.364	n.c.	0.248
t_{max}	[h]	8.0	0.50	8.0	8.0
$t_{1/2}$	[h]	n.c.	3.58	n.c.	n.c.
Range[a]	[h]	n.c.	5-24	n.c.	n.c.
MR[b]		n.a.	0.76	0.24	0.50

a = regression range shown instead of geometric mean
b = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.c. = not calculated
n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.2.6 R-9881 2.6.5.4 Table 4-25

表 2.6.4.3- 7 ラットに SS 体を 50mg/kg の用量で非絶食下 1 日 1 回反復経口投与したときの投与初日におけるダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ

		50 mg/kg (*S*,*S*)-darolutamide			
Analyte		**Darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	158000	11500	147000	219000
AUC_{norm}	[kg·h/L]	3.16	n.c.	2.94	4.38
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	157000	11400	146000	218000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	3.14	n.c.	2.92	4.16
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	12900	798	12100	25900
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.258	n.c.	0.242	0.518
t_{max}	[h]	0.50	0.50	0.50	0.50
$t_{1/2}$	[h]	3.22	3.10	3.24	3.09
Range[a]	[h]	5-24	5-24	5-24	5-24
MR[b]		n.a.	0.07	0.93	1.4

a = regression range shown instead of geometric mean
b = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.c. = not calculated
n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.2.6 R-9881 2.6.5.4 Table 4-27

表 2.6.4.3- 8 イヌにダロルタミドを 3mg/kg の用量で絶食下単回静脈内投与後のダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ（2 例の算術平均値）

		3 mg/kg Darolutamide[a]			
Analyte		**Darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	15100	12900	2150	15100
AUC_{norm}	[kg·h/L]	5.59	9.58	1.59	5.60
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	14300	12200	2080	14400
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	5.29	9.03	1.54	5.33
t_{last}	[h]	30	30	12-30[b]	30
C_{max}	[ng/mL]	3680	2170	1510	1690
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.36	1.61	1.12	0.626
t_{max}	[h]	0.08	0.08	0.08	0.5
$t_{1/2}$	[h]	6.6	6.8	4.5	7.9
Range[c]	[h]	2-30	2-30	2-12, 8-30	1-30, 8-30
CL	[L/(h·kg)]	0.19	0.11	0.70	n.a.
V_{ss}	[L/kg]	1.42	0.89	2.61	n.a.
MR[d]		n.a.	0.85	0.15	1.0

a = actual dose = 2.7 mg/kg, dose-normalization was carried out with respect to the actual dose
b = shown as range
c = regression range shown instead of arithmetic mean
d = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.2.2 R-9661 2.6.5.3 Table 3-3

表 2.6.4.3- 9 イヌに SR 体を 3mg/kg の用量で非絶食下単回静脈内投与後のダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ（2 例の算術平均値）

		3 mg/kg (*S*,*R*)-darolutamide			
Analyte		**Darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	55100	53700	n.a.	11700
AUC_{norm}	[kg·h/L]	18.4	17.9	n.c.	3.90
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	44300	42900	474	9470
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	14.8	14.3	n.c.	3.16
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C(0)	[ng/mL]	n.a.	6970	n.a.	n.a.
C_{max}	[ng/mL]	7140	n.a.	40.0	781
$C_{max,norm}$	[kg/L]	2.38	n.a.	n.c.	0.260
t_{max}[a]	[h]	0.083-0.25	n.a.	3-5	1.5-3
$t_{1/2}$	[h]	11.1	11.2	n.a.	10.0
Range[b]	[h]	5-24	5-24	n.a.	5-24
CL	[L/(h·kg)]	n.a.	62.0	n.a.	n.a.
V_{ss}	[mL/kg]	n.a.	837	n.a.	n.a.
MR[c]		n.a.	0.99	0.01	0.21

a = shown as range
b = regression range shown instead of arithmetic mean
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.a.= not applicable
n.c.= not calculated
Source: 4.2.2.2.3 R-9733 2.6.5.3 Table 3-5

表 2.6.4.3- 10 イヌに SS 体を 3mg/kg の用量で非絶食下単回静脈内投与後のダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ（2 例の算術平均値）

		3 mg/kg (*S*,*S*)-darolutamide			
Analyte		**Darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	5270	1120	4050	28000
AUC_{norm}	[kg·h/L]	1.76	n.c.	1.35	9.33
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	5050	893	3980	27000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	1.68	n.c.	1.33	9.01
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C(0)	[ng/mL]	n.a.	n.a.	7250	n.a.
C_{max}	[ng/mL]	4870	65.2	n.a.	4000
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.62	n.c.	n.a.	1.33
t_{max}	[h]	0.033	3	n.a.	0.5-1.5[a]
$t_{1/2}$	[h]	5.72	10.2	4.47	5.16
Range[b]	[h]	3-24	5-24	3-24	5-24
CL	[L/(h·kg)]	n.a.	n.a.	854	n.a.
V_{ss}	[mL/kg]	n.a.	n.a.	3780	n.a.
MR[c]		n.a.	0.18	0.82	5.45

a = shown as range
b = regression range shown instead of arithmetic mean
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.a.= not applicable
n.c.= not calculated
Source: 4.2.2.2.3 R-9733, 2.6.5.3 Table 3-6

表 2.6.4.3- 11 イヌにダロルタミドを懸濁液として 100mg/kg の用量で単回経口投与後のダロルタミド及び M-1 の薬物動態パラメータ（2 例の算術平均値）

		100 mg/kg Darolutamide			
		fasted		fed	
Analyte		**Darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**	**Darolutamide**	**M-1, Keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	82600	n.c.	95300	110000
AUC_{norm}	[kg·h/L]	0.826	n.c.	0.953	1.10
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	66600	77800	86300	101000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	0.666	0.778	0.863	1.01
t_{last}	[h]	28	28	28	28
C_{max}	[ng/mL]	4290	4890	5690	8090
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.0429	0.0489	0.0569	0.0809
t_{max}[a]	[h]	16-20	16-20	2-8	2-4
$t_{1/2}$	[h]	11.4	9.1	7.3	6.9
Range[b]	[h]	20-28	20-28	12-28	8/16-28
F[c]	[%]	12.6	n.a.	16.3	n.a.
MR[d]		n.a.	1.2	n.a.	1.2

a = shown as range
b = regression range shown instead of arithmetic mean
c = mean of n=2 animals, calculated from $AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$, iv values taken from 4.2.2.2.2 R-9661, 2.6.5.3 Table 3-4
d = metabolic ratio based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.c. = not calculated (only single animal value available)
n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.2.2 R-9661, 2.6.5.3 Table 3-4

表 2.6.4.3- 12 イヌにダロルタミドをカプセルに充填して 300mg（～25mg/kg）の用量で非絶食下単回経口投与後のダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ（4 例の算術平均値）

Analyte		300 mg (~25 mg/kg) Darolutamide			
		Darolutamide	(*S*,*R*)-darolutamide	(*S*,*S*)-darolutamide	M-1, Keto-darolutamide
AUC	[ng·h/mL]	67900[a]	65900[a]	6580	47200
AUC_{norm}	[kg·h/L]	2.79[a]	5.41[a]	0.501	1.83
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	57400	51500	5980	36000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	2.19	3.93	0.454	1.38
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	3510	3110	1130	2840
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.136	0.241	0.0855	0.111
t_{max}[b]	[h]	2-12	2-12	0.25-0.5	1.5-3
$t_{1/2}$	[h]	16.6[a]	19.5[a]	8.11	14.5
Range[c]	[h]	5-24[a]	5/8-24[a]	8-24	8-24
F[d]	[%]	41.4	n.a.	n.a.	n.a.
MR[e]		n.a.	0.90	0.10	0.63

a = arithmetic mean of 2 animals
b = shown as range
c = regression range shown instead of arithmetic mean
d = calculated from $AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$, iv values taken from Table 3-4
e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.2.3 R-9733, 2.6.5.3 Table 3-9

表 2.6.4.3- 13 イヌに SR 体をカプセルに充填して 300mg（～25mg/kg）の用量で非絶食下単回経口投与後のダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ（4 例の算術平均値）

Analyte		300 mg (~25 mg/kg) (*S*,*R*)-darolutamide			
		Darolutamide	(*S*,*R*)-darolutamide	(*S*,*S*)-darolutamide	M-1,Keto-darolutamide
AUC	[ng·h/mL]	133000[a]	131000	1840	35900[a]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	5.49[a]	5.43	n.c.	1.38[a]
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	92200	91200	1060	21900
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	3.60	3.55	n.c.	0.858
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	7390	7370	82.4	1380
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.290	0.289	n.c.	0.0535
t_{max}[b]	[h]	1.5-3	1.5-3	5-8	2-12
$t_{1/2}$	[h]	17.1[a]	17.2	11.8	13.9[a]
Range[c]	[h]	3 or 8-24[a]	3 or 8-24	8-24	3 or 5 or 8-24[a]
F[d]	[%]	n.a.	24.8	n.a.	n.a.
MR[e]		n.a.	0.99	0.01	0.24

a = arithmetic mean of 3 animals, b = shown as range, c = regression range shown instead of arithmetic mean, d = calculated from $AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$, iv values taken from 2.6.5.3 Table 3-7, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated
Source: 4.2.2.2.3 R-9733 2.6.5.3 Table 3-7

表 2.6.4.3- 14 イヌに SS 体をカプセルに充填して 300mg（～25mg/kg）の用量で非絶食下単回経口投与後のダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の薬物動態パラメータ（4 例の算術平均値）

		300 mg (~25 mg/kg) (*S*,*S*)-darolutamide			
Analyte		**Darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**M-1, keto-darolutamide**
AUC	[ng·h/mL]	22400	n.a.	12000[a]	88400
AUC_{norm}	[kg·h/L]	0.878	n.c.	0.500[a]	3.50
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	19100	3690	15400	80900
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	0.746	n.c.	0.597	3.20
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	2230	244	2170	11600
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.0881	n.c	0.0855	0.462
t_{max}[b]	[h]	0.25-1.5	5-12	0.25-1.5	1.5
$t_{1/2}$	[h]	9.20	n.a.	5.82	7.44
Range[c]	[h]	3 or 5-24	n.a.	5 or 8-24	5 or 8-24
F[d]	[%]	n.a.	n.a.	44.9	n.a.
MR[e]		n.a.	0.19	0.81	4.2

a = arithmetic mean of 3 animals, b = shown as range, c = regression range shown instead of arithmetic mean, d = calculated from $AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$, iv values taken from 2.6.5.3, Table 3–8, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on $AUC(0\text{-}t_{last})$
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated
Source: 4.2.2.2.3 R-9733 2.6.5.3 Table 3-8

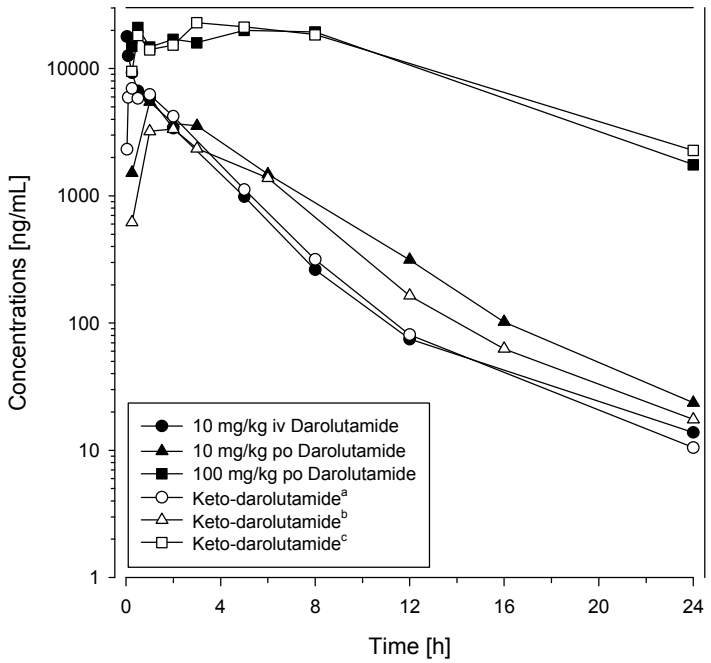


図 2.6.4.3- 1 ラットにダロルタミドを単回静脈内及び経口投与したときのダロルタミド及び M-1 の血漿中濃度（算術平均値）
Darolutamide doses: a = 10 mg/kg iv, b = 10 mg/kg po, c = 100 mg/kg po
Source: 4.2.2.2.6 R-9881, 4.2.2.5.1 R-9663, 4.2.2.2.1 PH-40003

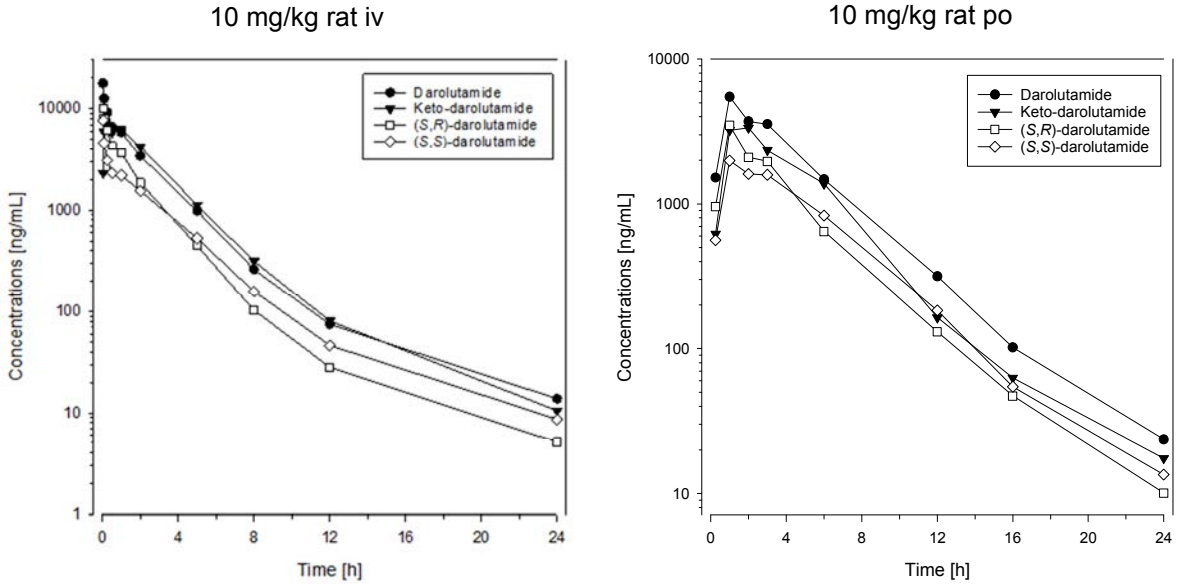


図 2.6.4.3- 2　　ラットにダロルタミドを 10mg/kg の用量で単回静脈内及び経口投与したときのダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の平均血漿中濃度
Source: 4.2.2.5.1 R-9663, 4.2.2.2.1 PH-40003

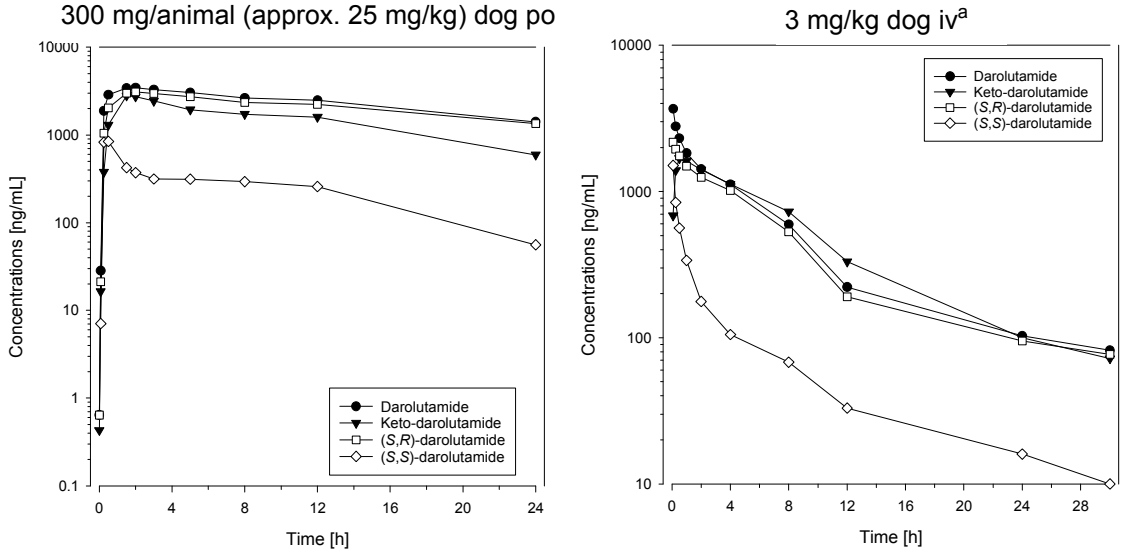


図 2.6.4.3- 3　　イヌにダロルタミドを単回静脈内及び経口投与したときのダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の平均血漿中濃度
a = actual dose: 2.7 mg/kg
Source: 4.2.2.2.2 R-9661, 4.2.2.2.3 R-9733

2.6.4.3.2　反復投与後の薬物動態

参照項目：4.2.2.2.4　R-9723
4.2.2.2.5　R-9919
4.2.2.2.6　R-9881
4.2.3.2.4　R-9668
4.2.3.2.8　R-9667
4.2.2.2.7　R-9976

雄性マウス及び雄性ラットにおけるダロルタミドの反復経口投与薬物動態試験の概要を表 2.6.4.3- 15 に、雌雄ラット及び雄性イヌにおけるトキシコキネティクスの概要を表 2.6.4.3- 16 に示す。また、これらの試験より得られた薬物動態パラメータを表 2.6.4.3- 17～表 2.6.4.3- 23 に示す。イヌではダロルタミドの独立した反復投与薬物動態試験は実施しなかった。なお、未成熟ラットを用いた反復経口投与薬理試験（2.6.2.2.2.1）を支持するための薬物動態試験の概要及び薬物動態パラメータは 2.6.5.4 Table 4-29 及び Table 4-30 に示す。

雄性マウスにダロルタミドを 25、50 及び 100mg/kg の用量で 1 日 2 回 7 日間反復経口投与したとき、ダロルタミドの定常状態における全身曝露量 AUC(0-24)は 25mg/kg から 100mg/kg の間で用量比を下回って増加する傾向が認められた。50mg/kg 及び 100mg/kg の間で比較すると、AUC(0-24)の増加は用量比を明らかに下回った（表 2.6.4.3- 17）。最終投与 24 時間後の濃度は低かった（C_{max} の 0.02～1.75%）。SR 体と SS 体の存在比は定常状態における AUC(0-24)において平均値で約 8:2 であった（表 2.6.4.3- 21）。M-1 の定常状態における AUC(0-24)は親化合物の 2.2～3.4 倍であり、用量に伴って上昇した（表 2.6.4.3- 21）。

雄性ラットにダロルタミドを 100mg/kg の用量で 1 日 1 回 6 日間反復経口投与したとき、定常状態のダロルタミドの C_{max} 及び AUC(0-24)に変化は認められず、反復投与の影響はなかった（表 2.6.4.3- 17）。投与初日及び 6 日目における濃度は低く、それぞれの投与日の C_{max} に対して 8.3%及び 2.9%の濃度であった。雌雄ラットにダロルタミドを 100、300 及び 1000mg/kg の用量で 1 日 1 回 4 週間反復経口投与（トキシコキネティクス）したとき、定常状態におけるダロルタミドの曝露量は、雌性ラットで雄性ラットと比べて高い傾向を示し、AUC(0-24)で最大 1.8 倍、C_{max} で最大 1.6 倍高値であった（表 2.6.4.3- 22）。投与 24 時間後のトラフ濃度はほとんどの場合に低く、初回投与及び 28 日目投与後の C_{max} の 17%未満であった。定常状態における曝露量 AUC(0-24)及び C_{max} は、雌雄共に低用量から高用量の間で用量比を下回る増加を示した（表 2.6.4.3- 22）。初回投与の曝露量と比較して 28 日目におけるダロルタミドの全身曝露量 C_{max} 及び AUC(0-24)は雌雄共に減少傾向を示した（表 2.6.4.3- 22）。雄性ラットに 100mg/kg を 1 日 1 回経口投与 6 日目の定常状態 AUC(0-24)における SR 体と SS 体との比は 4：6 であった。また、1 日 1 回 28 日間投与した雄性ラットでも同様の結果が得られ、比は 5：5～4：6 であった（表 2.6.4.3- 21）。雄性ラットに投与 6 日目及び 28 日目における M-1 の AUC(0-24)は用量にかかわらず親化合物の 1.2～1.4 倍であった。

雄性イヌにダロルタミドを 1 日 1 回 50、200 及び 800mg/kg の用量で反復経口投与（トキシコキネティクス）したとき、ダロルタミド及び M-1 の定常状態におけるみかけの曝露量 AUC(0-24)及び C_{max} は、ラットと同様に低用量～高用量の間で用量比を下回って増加した（表 2.6.4.3- 22、表 2.6.4.3- 23）。ダロルタミド及び M-1 共に C_{max} は投与後 1.5～6 時間の間に認められた。投与 28 日目のダロルタミド及び M-1 のトラフ濃度は、最大で C_{max} の約 40%と比較的高く、全投与期間中の持続的な全身曝露が示された。投与 28 日目のダロルタミド及び M-1 のみかけの全身曝露量 AUC(0-24)及び C_{max} は初回投与時と比較して、50、200 及び 800mg/kg のすべての用量で変化は認められなかった（表 2.6.4.3- 22 及び表 2.6.4.3- 23）。雄性イヌにおいて投与 28 日目の定常状態 AUC(0-24)における SR 体と SS 体の比はすべての用量で 9：1 であった（表 2.6.4.3- 21）。雄性イヌに投与 28 日目の M-1 の AUC(0-24)は、すべての用量で親化合物の 0.7 倍であった（表 2.6.4.3- 21）。

表 2.6.4.3- 15 マウス及びラット反復投与薬物動態試験の概要

Study type	Repeated dose pharmacokinetics, *in vivo* study
Bayer reference	4.2.2.2.4 R-9723, 2.6.5.4 Table 4-11 to Table 4-22 (7 day study)
Test system	Balb/c-nu mice, 35 / 55 males / dose group, 5 / time point
Dosage	Darolutamide: 50 mg/kg/d qd po 50 mg/kg/d bid po
Feeding condition	ad libitum
Vehicle/	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Vol. of administration	5 mL/kg gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples
Bayer reference	4.2.2.2.5 R-9919, 2.6.5.4 Table 4-1 and Table 4-2 (7 day study)
Test system	Balb/c-nu mice, 55 males / dose group, 5 / time point
Dosage	Darolutamide: 25 mg/kg/d bid po 100 mg/kg/d bid po
Feeding condition	ad libitum
Vehicle/	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Vol. of administration	5 mL/kg gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples
Bayer reference	4.2.2.2.6 R-9881, 2.6.5.4 Table 4-23 and Table 4-24 (6 day study)
Test system	Wistar rats (fed), 8 males / dose group, 4 / time point
Dosage	Darolutamide: 100 mg/kg/d qd po
Vehicle/	65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)
Vol. of administration	4 mL/kg, gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples

表 2.6.4.3- 16 ラット及びイヌのトキシコキネティクス概要

Study type	Toxicokinetics
Bayer reference	4.2.3.2.4 R-9668 (4 week study)
Test system	Wistar rats, 48 females or males / dose group
Dosage	Darolutamide :100, 300, 1000 mg/kg/d qd po
Vehicle/	Suspension of methylcellulose (0.5%) and Tween 80 (0.5%)
Vol. of administration	10 mL/kg gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples
Bayer reference	4.2.3.2.8 R-9667 (4 week study)
Test system	Dogs, 4 males / dose group
Dosage	Darolutamide :50, 200, 800 mg/kg/d qd po
Vehicle/	Suspension of methylcellulose (0.5%) and Tween 80 (0.5%)
Vol. of administration	5 mL/kg gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma samples

表 2.6.4.3- 17 雄性マウス及びラットにダロルタミドを反復投与後のダロルタミドの薬物動態パラメータ

Daily dose [mg/kg]	Day	C_{max} [ng/mL]	T_{max} [h]	C(24)/C_{max} [%]	$t_{1/2}$ [h]	AUC(0-24) [ng·h/mL]	RA_{Cmax}	RA_{AUC}
Mouse study 4.2.2.2.4 R-9723								
50 qd	7	28896	0.5	0.00350	1.4	109479	n.a	n.a
50 bid	7	42712	8.5[a]	0.125	1.6	174807	n.a	n.a
Mouse study 4.2.2.2.5 R-9919								
25 bid	7	27608	8.5[a]	0.0217	1.4	108618	n.a	n.a
100 bid	7	57740	8.5[a]	1.75	2.6	224876	n.a	n.a
Rat study 4.2.2.2.6 R-9881								
100 qd	1	21100	0.5	8.34	5.1	312000	n.a	n.a
100 qd	6	18600	3	2.87	3.7	250000	0.9	0.8

a = corresponds to 0.5 h post second dose 8 h after the first dose
n.a. = not applicable

表 2.6.4.3- 18 雄性マウス及びラットにダロルタミドを反復投与後の SR 体の薬物動態パラメータ

Daily dose [mg/kg]	Day	C_{max} [ng/mL]	T_{max} [h]	C(24)/C_{max} [%]	$t_{1/2}$ [h]	AUC(0-24) [ng·h/mL]	RA_{Cmax}	RA_{AUC}
Mouse study 4.2.2.2.4 R-9723								
50 qd	7	21980	0.5	0.00460	1.4	88416	n.a	n.a
50 bid	7	30820	8.5[a]	0.135	1.6	133263	n.a	n.a
Mouse study 4.2.2.2.5 R-9919								
25 bid	7	22240	8.5[a]	0.0225	1.3	89742	n.a	n.a
100 bid	7	39420	8.5[a]	2.04	2.7	166096	n.a	n.a
Rat study 4.2.2.2.6 R-9881								
100 qd	1	14600	0.5	4.69	4.6	156000	n.a	n.a
100 qd	6	9790	0.5	2.12	3.7	103000	0.7	0.7

a = corresponds to 0.5 h post second dose 8 h after the first dose
n.a. = not applicable

表 2.6.4.3- 19 雄性マウス及びラットにダロルタミドを反復投与後の SS 体の薬物動態パラメータ

Daily dose [mg/kg]	Day	C_{max} [ng/mL]	T_{max} [h]	C(24)/C_{max} [%]	$t_{1/2}$ [h]	AUC(0-24) [ng·h/mL]	RA_{Cmax}	RA_{AUC}
Mouse study 4.2.2.2.4 R-9723								
50 qd	7	7410	0.25	n.c.	1.3	21063	n.a	n.a
50 bid	7	11892	8.5[a]	0.100	1.6	41544	n.a	n.a
Mouse study 4.2.2.2.5 R-9919								
25 bid	7	5368	8.5[a]	0.0186	1.5	18876	n.a	n.a
100 bid	7	18320	8.5[a]	1.14	2.4	58780	n.a	n.a
Rat study 4.2.2.2.6 R-9881								
100 qd	1	10400	8.0	10.4	n.c.	156000	n.a	n.a
100 qd	6	9650	5.0	3.38	n.c.	147000	0.9	0.9

a = corresponds to 0.5 h post second dose 8 h after the first dose
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

表 2.6.4.3- 20 雄性マウス及びラットにダロルタミドを反復投与後の M-1 の薬物動態パラメータ

Daily dose [mg/kg]	Day	C_{max} [ng/mL]	T_{max} [h]	$C(24)/C_{max}$ [%]	$t_{1/2}$ [h]	AUC(0-24) [ng·h/mL]	RA_{Cmax}	RA_{AUC}
Mouse study 4.2.2.2.4 R-9723								
50 qd	7	38020	0.5	0.0133	1.4	279632	n.a	n.a
50 bid	7	66900	8.5[a]	0.450	1.8	533522	n.a	n.a
Mouse study 4.2.2.2.5 R-9919								
25 bid	7	33760	10	0.0859	1.4	234181	n.a	n.a
100 bid	7	98660	10	3.98	3.1	763071	n.a	n.a
Rat study 4.2.2.2.6 R-9881								
100 qd	1	23000	3	9.91	5.7	317000	n.a	n.a
100 qd	6	25800	3	3.18	3.8	355000	1.12	1.12

a = corresponds to 0.5 h post second dose 8 h after the first dose.
n.a. = not applicable

表 2.6.4.3- 21 雄性マウス、ラット及びイヌにダロルタミドを反復経口投与したときの SR 体と SS 体の AUC(0-24)比、M-1 のダロルタミドに対する AUC(0-24)比

Daily dose [mg/kg]	Day	(*S*,*R*)-darolutamide[a]	(*S*,*S*)-darolutamide[a]	Keto-darolutamide[a]
Mouse study 4.2.2.2.4 R-9723				
50 qd	7	0.8	0.2	2.6
50 bid	7	0.8	0.2	3.1
Mouse study 4.2.2.2.5 R-9919				
25 bid	7	0.8	0.2	2.2
100 bid	7	0.7	0.3	3.4
Rat study 4.2.2.2.6 R-9881				
100 qd	1	0.5	0.5	1.0
100 qd	6	0.4	0.6	1.4
Rat study 4.2.3.2.4 R-9668[b]				
100 qd	28	0.5	0.5	1.2
300 qd	28	0.4	0.6	1.3
1000 qd	28	0.4	0.6	1.3
Dog study 4.2.3.2.8 R-9667[c]				
50 qd	28	0.9	0.1	0.7
200 qd	28	0.9	0.1	0.7
800 qd	28	0.9	0.1	0.7

a = diastereomeric ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide, based on AUC(0-t_{last})
b = ratios calculated from data presented in 4.2.3.2.4 R-9668, App. 21
c = ratios calculated from data presented in 4.2.3.2.8 R-9667, App. 21

表 2.6.4.3- 22 ラット及びイヌのダロルタミド 4 週間反復経口投与毒性試験におけるダロルタミドの全身曝露量

Daily dose [mg/kg]	Day/ sex	C_{max} [ng/mL]	T_{max} [h]	AUC(0-24) [ng·h/mL]	$AUC(0\text{-}24)_{norm}$ [kg·h/L]	$C(24)/C_{max}$[a] [%]	RA_{Cmax}	RA_{AUC}
Rat study 4.2.3.2.4 R-9668								
100 qd	1 / f	10800	2.00	103300	1.03	1.31	n.a.	n.a.
300 qd	1 / f	16400	2.00	246600	0.822	3.57	n.a.	n.a.
1000 qd	1 / f	29000	10.0	502200	0.502	10.7	n.a.	n.a.
100 qd	1 / m	12200	2.00	137100	1.37	3.44	n.a.	n.a.
300 qd	1 / m	14100	10.0	225200	0.751	5.03	n.a.	n.a.
1000 qd	1 / m	22100	6.50	362100	0.362	16.5	n.a.	n.a.
100 qd	28 / f	15500	3.50	160400	1.60	1.90	1.4	1.6
300 qd	28 / f	18900	2.00	215700	0.719	3.95	1.2	0.9
1000 qd	28 / f	20200	3.50	241700	0.242	1.17	0.7	0.5
100 qd	28 / m	9460	2.00	88060	0.881	1.69	0.8	0.6
300 qd	28 / m	12500	3.50	147400	0.491	1.32	0.9	0.7
1000 qd	28 / m	14300	3.50	206500	0.207	7.20	0.6	0.6
Daily dose [mg/kg]	**Day/ sex**	**C_{max} [ng/mL]**	**T_{max} [h]**	**AUC(0-24) [ng·h/mL]**	**$AUC(0\text{-}24)_{norm}$ [kg·h/L]**	**$C(24)/C_{max}$[b] [%]**	**RA_{Cmax}**	**RA_{AUC}**
Dog study 4.2.3.2.8 R-9667								
50 qd	1 / m	4570	1.50	64990	1.30	36.3	n.a.	n.a.
200 qd	1 / m	10200	6.00	178100	0.891	40.8	n.a.	n.a.
800 qd	1 / m	12300	6.00	213400	0.267	35.0	n.a.	n.a.
50 qd	28 / m	5030	2.00	71000	1.42	31.6	1.1	1.1
200 qd	28 / m	9300	4.00	157200	0.786	39.7	0.9	0.9
800 qd	28 / m	9990	4.00	162200	0.203	35.8	0.8	0.8

n.a. = not applicable
a = calculated from data presented in 4.2.3.2.4 R-9668, App. 21, Tab. M
b = calculated from data presented in 4.2.3.2.8 R-9667, App. 21, Tab. M

表 2.6.4.3- 23 ラット及びイヌの 4 週間反復経口投与毒性試験における M-1 の全身曝露量

Daily dose [mg/kg]	Day/ sex	C_{max} [ng/mL]	T_{max} [h]	AUC(0-24) [ng·h/mL]	AUC_{norm}[a] [kg·h/L]	C(24)/C_{max}[b] [%]	RA_{CMax} [%]	RA_{AUC}[a] [%]	MR C_{max}	MR AUC[a]
Rat study 4.2.3.2.4 R-9668										
100	1/f	9470	2.0	90440	0.904	1.28	n.a.	n.a.	0.9	0.9
300	1/f	13400	2.0	181200	0.604	3.25	n.a.	n.a.	0.8	0.7
1000	1/f	25000	8.5	442900	0.443	15.8	n.a.	n.a.	0.9	0.9
100	1/m	12200	5.0	154400	1.54	3.69	n.a.	n.a.	1.0	1.1
300	1/m	16000	8.5	241600	0.806	4.44	n.a.	n.a.	1.1	1.1
1000	1/m	23500	6.5	393300	0.393	18.5	n.a.	n.a.	1.1	1.1
100	28/f	13400	3.5	144400	1.44	1.97	1.4	1.6	0.9	0.9
300	28/f	17400	2.0	208600	0.695	4.20	1.3	1.2	0.9	1.0
1000	28/f	21000	2.0	248300	0.248	1.15	0.8	0.6	1.0	1.0
100	28/m	11500	2.0	104400	1.04	1.23	0.9	0.7	1.2	1.2
300	28/m	16800	2.0	198200	0.661	1.04	1.1	0.8	1.3	1.3
1000	28/m	18800	2.0	277300	0.277	6.81	0.8	0.7	1.3	1.3
Daily dose [mg/kg]	**Day/ sex**	**C_{max} [ng/mL]**	**T_{max} [h]**	**AUC(0-24) [ng·h/mL]**	**AUC_{norm}[a] [kg·h/L]**	**C(24)/C_{max}[c] [%]**	**RA_{CMax} [%]**	**RA_{AUC}[a] [%]**	**MR C_{max}**	**MR AUC[a]**
Dog study 4.2.3.2.8 R-9667										
50	1/m	4880	2.0	56830	1.14	20.7	n.a.	n.a.	1.1	0.9
200	1/m	10700	4.0	156100	0.781	13.9	n.a.	n.a.	1.0	0.9
800	1/m	14500	6.0	228100	0.285	14.9	n.a.	n.a.	1.2	1.1
50	28/m	4720	1.5	51230	1.03	14.3	1.0	0.9	0.9	0.7
200	28/m	7780	3.0	103700	0.519	12.8	0.7	0.7	0.8	0.7
800	28/m	7890	3.0	106500	0.133	15.1	0.5	0.5	0.8	0.7

n.a. = not applicable
a = AUC = AUC(0-24)
b = calculated from data presented in 4.2.3.2.4 R-9668, App. 21, Tab. V
c = calculated from data presented in 4.2.3.2.8 R-9667, App. 21, Tab. X

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 血漿タンパク結合と血球移行

参照項目： 4.2.2.3.1 R-9664
4.2.2.3.3 R-9883
4.2.2.3.4 PH-39986
4.2.2.3.2 R-9729

タンパク結合に関する試験の概要を表 2.6.4.4- 1 に示す。ヒト及び動物の血漿タンパクに対するダロルタミドの結合は中等度～高かった。ラット、イヌ及びヒト血漿タンパクに対する結合は SR 体と SS 体間で同等であった（表 2.6.4.4- 2、表 2.6.4.4- 3）。ダロルタミドの血漿タンパク結合には種差が認められた。マウス、ラット及びヒトでは濃度依存性はみられず、非結合型分率の平均値はそれぞれ 4.7%、5.4%及び 8.0%であったが（表 2.6.4.4- 2）、イヌでは血漿タンパク結合に濃度依存性が認められ、濃度の上昇に伴い結合の飽和が認められた（表 2.6.4.4- 3）。すなわち、ダロルタミドの非結合型分率は 20～5000ng/mL の範囲で 0.7%から 8.4%に上昇し、SR 体及び SS 体の場合には 1000～20000ng/mL の範囲で 0.3%から 11%に上昇した（表 2.6.4.4- 3）。

代謝物 M-1 のヒト及び動物の血漿に対する結合も中等度～高かったが、それぞれの動物種で親化合物の結合の程度をかなり上回るものであった。M-1 のマウス、ラット及びヒト血漿タンパク

に対する結合に濃度依存性はみられず、非結合型分率の平均値はそれぞれ 0.82%、0.74%及び 0.20%であった。イヌ血漿では濃度依存的な結合が認められ、濃度 200～10000ng/mL の範囲で非結合型分率は 0.3%から 3.4%に上昇した（表 2.6.4.4- 4）。

ヒト血漿中におけるダロルタミド及び M-1 の主な結合タンパク種はヒト血清アルブミン（HSA）であった（表 2.6.4.4- 2、表 2.6.4.4- 4）。M-1 のα_1-酸性糖タンパク（α_1-AGP）に対する結合は、α_1-AGP の生理的モル濃度を超える最高 M-1 濃度 10000ng/mL までの検討において飽和が認められた。しかしながら、主要な結合タンパク種は HSA であることから、α_1-AGP に対する M-1 の結合飽和の臨床的な意義は低いと考えられた。10%FCS 含有 Williams 培地におけるダロルタミド及び M-1 の結合率は低く、非結合型分率はそれぞれ 67.4%及び 51.2%であった。また、ヒト肝ミクロソーム（HLM）に対する結合率も低かった。

In vitro において、血液中濃度の血漿中濃度に対する比（C_B/C_P）は親化合物及び代謝物 M-1 共にすべての動物で 1 未満であり（表 2.6.4.4- 5）、血球への移行はごくわずかであることが示された。イヌ血液中の M-1 については、濃度の増加と共に C_B/C_P が増加し、200～10000ng/mL の濃度において 0.5 から 0.7 に増加したが、これはタンパク結合の濃度依存性の影響と考えられた。ダロルタミドについては濃度依存的な C_B/C_P の増加は認められなかったが、これはおそらく最高濃度が 1000ng/mL と、M-1 検討時と比較して低濃度であったことによると考えられた。

表 2.6.4.4- 1　タンパク結合試験の概要

Study type	*In vitro* assay, equilibrium dialysis
Bayer reference	4.2.2.3.1 R-9664, 2.6.5.6 Table 6-1 to 6-2
Test item	[^{14}C]darolutamide[a]
Species	Mouse (CD-1, Balb/c), Rat (Wistar), Dog (Beagle), Human plasma, HSA, AGP
Bayer reference	4.2.2.3.3 R-9883, 2.6.5.6 Table 6-5 to 6-7
Test item	Darolutamide　Keto-darolutamide
Species	Mouse (CD-1, Balb/c), Rat (Wistar), Dog (Beagle), Human plasma, HSA, AGP
Bayer reference	4.2.2.3.4 PH-39986, 2.6.5.6 Table 6-8 to 6-9
Test item	[^{14}C]darolutamide[b]　[^{14}C]keto-darolutamide[c]
Species	Williams medium with 10% FCS, HLM (0.05, 0.1, 0.5 g/L)
Bayer reference	4.2.2.3.2 R-9729, 2.6.5.6 Table 6-3 to 6-4
Test item	(*S*,*R*)-darolutamide　(*S*,*S*)-darolutamide
Species	Rat (Wistar), Dog (Beagle), Human plasma

HSA = huma serum albumin, AGP = α1-acid glycoprotein, FCS = fetal calf serum, HLM = human liver microsomes
a = specific activity: 3.33 MBq/mg
b = specific activity: 2.60 MBq/mg
c = specific activity: 2.54 MBq/mg

表 2.6.4.4- 2 種々動物の血漿タンパク及びヒトタンパクにおけるダロルタミド、SR 体及び SS 体の非結合型分率（fu）（%）

Species	**Darolutamide [ng/mL]**	**(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide [ng/mL]**	**Mean f_u [%]**
Mouse	20 – 5000		4.7
Rat	20 – 5000	1000 – 10000	5.4
Human	20 – 5000	1000 – 10000	8.0
HSA	20 – 5000		14.3
AGP	20 – 5000		57.2
FCS (10%) in Williams medium	100 – 5000		67.4
HLM	407 – 7935		92.1

Source: 4.2.2.3.1 R-9664, 4.2.2.3.2 R-9729, 4.2.2.3.3 R-9883, 4.2.2.3.4 PH-39986

表 2.6.4.4- 3 イヌ血漿タンパクにおけるダロルタミド、SR 体及び SS 体の非結合型分率（fu）（%）

Darolutamide [ng/mL]	**f_u [%]**	**(*S*,*R*)-darolutamide [ng/mL]**	**f_u [%]**	**(*S*,*S*)-darolutamide [ng/mL]**	**f_u [%]**
20	0.9	1000	0.3	1000	n.c.
100	0.7	2000	0.3	2000	0.3
100	0.9	5000	0.8	5000	0.9
1000	1.3	10000	5.1	10000	5.8
5000	8.4	20000	10.2	20000	11.3

Source: 4.2.2.3.1 R-9664, 4.2.2.3.3 R-9883, 4.2.2.3.2 R-9729

表 2.6.4.4- 4 種々動物の血漿タンパク及びヒト精製タンパクにおける M-1 の非結合型分率（fu）（%）

Species	**M-1, keto-darolutamide [ng/mL]**	**f_u [%]**	**Mean f_u [%]**
Mouse	200 – 10000		0.82
Rat	200 – 10000		0.74
Dog (Beagle)	200	0.3	
Dog (Beagle)	1000	0.4	
Dog (Beagle)	5000	2.3	
Dog (Beagle)	10000	3.4	
Human	200 – 10000		0.20
HSA	200 – 10000		0.34
AGP	200	33.9	
AGP	1000	39.7	
AGP	5000	46.3	
AGP	10000	48.7	
FCS (10%) in Williams' medium	100 – 5000		51.2
HLM	387 – 7713		91.4

Source: 4.2.2.3.3 R-9883, 4.2.2.3.4 PH-39986

表 2.6.4.4- 5 ダロルタミド及び M-1 の血球移行

Species	Darolutamide			Keto-darolutamide, M-1		
	Concentration [ng/mL]	C_P/C_B	C_B/C_P	Concentration [ng/mL]	C_P/C_B	C_B/C_P
Mouse (Balb/c)	20 – 1000	1.76	0.570	200 – 10000	1.86	0.539
Rat (Wistar)	20 – 1000	1.53	0.655	200 – 10000	1.95	0.515
Dog (Beagle)	20 – 1000	2.05	0.488	200	2.02	0.496
Dog (Beagle)				1000	1.88	0.534
Dog (Beagle)				10000	1.52	0.661
Human	20 – 1000	1.30	0.772	200 – 10000	1.98	0.507

Source: 4.2.2.3.1 R-9664, 4.2.2.3.3 R-9883

2.6.4.4.2 臓器・組織分布

2.6.4.4.2.1 マウス

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

マウスにおける臓器・組織分布試験の概要を表 2.6.4.4- 6 に示す。雄性マウスにダロルタミドを 25、50 及び 100mg/kg の用量で 1 日 2 回反復経口投与し、前立腺を含む主要臓器・組織中のダロルタミド及び M-1 濃度を、開発初期に確立した LC-MS/MS 法により測定した。ダロルタミドについて、臓器・組織曝露量〔$AUC(0\text{-}t_{last})$〕の血漿曝露量に対する比が最も大きかったのは排泄器官である肝臓及び腎臓であり、それぞれ最大で 4.5 及び 1.7 であった。一方、脳の曝露量は小さく、血漿に対して 0.02～0.04 であった。標的組織の前立腺におけるダロルタミドの曝露量は血漿に対して 0.25～0.56 であった（2.6.5.4 Table 4-3、Table 4-4、Table 4-15）。SR 体についてはすべての臓器・組織の曝露量は血漿に対して 0.02～3.72 の範囲にあり、SS 体の 0.03～6.80 よりも低かった（2.6.5.4 Table 4-5～Table 4-8、Table 4-16、Table 4-17）。代謝物 M-1 について、臓器・組織曝露量の血漿曝露量に対する比は 0.02～0.5 であり親化合物より低かった。一方、脳では親化合物と同程度であり、血漿に対して 0.02～0.03 であった（2.6.5.4 Table 4-9、Table 4-10、Table 4-18）。

表 2.6.4.4- 6 マウスにおける臓器・組織分布試験の概要

Study type	Quantitative, cut and count (LC-MS/MS)
Bayer reference	4.2.2.2.4 R-9723, 2.6.5.4 Table 4-15 to 4-18
Test system	Mice, 35 males (plasma; 5/time point), 25 males (organs: pool 5/time point), strain: Balb/c-nu
Dosage	Darolutamide : 50 mg/kg bid po (for 7 days)
Vehicle/	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Vol. of administration	5 mL/kg, gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma, liver, brain, kidney, prostate samples
Bayer reference	4.2.2.2.5 R-9919, 2.6.5.4 Table 4-1 to 4-10
Test system	Mice, 55 males (plasma: 5/time point), 35 males (organs: pool 5/time point), strain: Balb/c-nu
Dosage	Darolutamide : 25 mg/kg/d bid po (for 7 days) 100 mg/kg bid po (for 7 days)
Vehicle/	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Vol. of administration	5 mL/kg, gavage
Assay, matrix	LC-MS/MS, plasma, liver, brain, heart, kidney, prostate samples

2.6.4.4.2.2　ラット

参照項目：　4.2.2.3.5　R-9747

ラットにおける定量的臓器・組織分布試験の概要を表 2.6.4.4- 7 に示す。また、アルビノラットに[^{14}C]ダロルタミドを経口投与 12 時間後の全身オートラジオグラフィを図 2.6.4.4- 1 に、薬物動態パラメータを表 2.6.4.4- 8 に示す。

雄性アルビノラットに[^{14}C]ダロルタミドを経口投与後、放射能の吸収は緩慢であった。大半の臓器・組織では投与 12 時間後に最高濃度に到達し、各臓器・組織の最高濃度は血液と同程度であった。投与 12 時間後のラット体内には投与量の 14.9%が残存していた。

放射能は、血液から全身の臓器・組織に広範かつ均一に分布した（図 2.6.4.4- 1）。多くの臓器・組織の曝露量 AUC(0-24)は血液と同程度かそれよりも低かった。排泄器官である肝臓及び腎臓の AUC(0-24)は血液よりも高かったが、その程度は顕著ではなかった。脳及び脊髄の曝露量は低く、血液脳関門の通過性は低いことが示された〔脳 AUC(0-24)／血液 AUC(0-24)＝0.079、脳 AUC(0-24)／血漿 AUC(0-24)＝0.045〕。精巣の曝露量の血液に対する比は 0.34 であったことから、血液から精巣への移行は中等度であることが示唆された。膀胱内容物（尿）及び胆管内容物（胆汁）に認められた一貫して高い放射能濃度は、速やかかつ持続的な放射能の排泄を反映するものであった。

放射能は大半の臓器・組織から速やかに消失し、12～24 時間の間隔において算出した消失半減期は 3～8 時間の範囲であった。ほとんどすべての臓器・組織において、投与 24 時間以降の放射能濃度は定量下限を下回ったが、排泄器官である肝臓、腎臓、内分泌・外分泌腺及び消化管粘膜では極めて低濃度ながらも放射能が認められた。これらの臓器・組織において、最長で 72 又は 168 時間までの範囲で算出した消失半減期は 6.5～30.3 時間であった。投与 72 時間後には放射能はラット体内からほぼ完全に消失し、残存した放射能は投与量の 0.088%に過ぎなかったが、主に肝臓及び皮膚に認められた。投与 168 時間後には、放射能は更に減少し、ラット体内の残存放射能は投与量の 0.009%であった。

有色ラットにおける放射能の定量的分布パターンは、ほぼアルビノラットと同じであり、大半の臓器・組織における曝露量及び消失半減期もアルビノラットとおおむね同じであった。皮膚有色部における放射能の消失半減期が最も長く、168 時間までの間隔において 203 時間と算出された。しかしながら、投与 168 時間における濃度は低く、投与量の約 0.16%が存在したに過ぎなかった。この結果から放射能のメラニン含有組織への結合はわずかで、かつ可逆的であることが示された。672 時間後の有色ラット体内に残存した放射能は少なく、投与量の 0.14%であった。

表 2.6.4.4- 7　ラットにおける定量的臓器・組織分布試験の概要

Study type	Quantitative whole body-autoradiography		
Bayer reference	4.2.2.3.5 R-9747, 2.6.5.5 Table 5-1 to Table 5-4		
Study design	Rats, 1 animal/time point		
Admin. route	Dosage [^{14}C]darolutamide[a]	Species / sex	Sacrifice time
po	100 mg/kg	Wistar rat / male	0.25, 1, 6, 12, 24, 72, 168 h
po	100 mg/kg	Lister Hooded rat / male	24, 72, 168, 672 h
Vehicle	po administration ： 50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v) 5 mL/kg, gavage		
Assay	Radioluminography		

a = specific activity: 2.7 MBq/mg

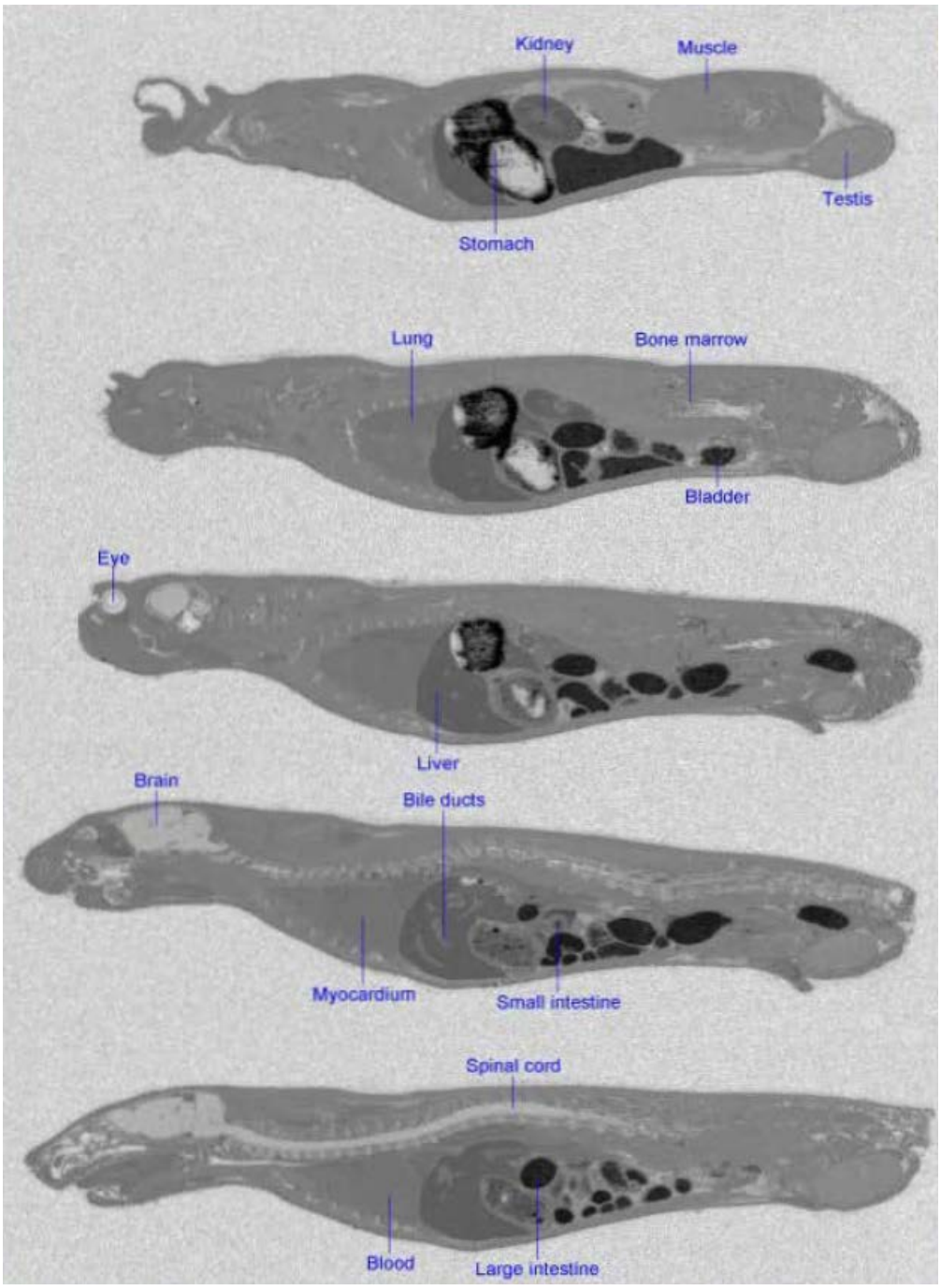


図 2.6.4.4- 1　雄性 Wistar 系ラットに[^{14}C]ダロルタミドを 100mg/kg の用量で経口投与後 12 時間における放射能の分布

Source: 4.2.2.3.5 R-9747

表 2.6.4.4- 8 雄性 Wistar 系ラットに[^{14}C]ダロルタミドを 100mg/kg の用量で単回経口投与後の臓器・組織中放射能濃度の薬物動態パラメータ

Organs/tissues	Ceq_{max} [mg-eq/kg]	t_{max} [h]	AUC(0-24) [mg-eq·h/kg]	$t_{1/2}$[a] [h]	Regression range [h]
Adrenal Cortex	44.0	12	681	~4.06	12.0-24.0
Adrenal medulla	32.6	6	538	~4.20	12.0-24.0
Aortic wall	34.3	12	502	~3.73	12.0-24.0
Bile duct contents	90.5	1	1580	55.8	1.00-24.0
Blood (LSC)	32.0	12	463	~3.77	12.0-24.0
Blood (WBA)	27.3	12	412	~3.69	12.0-24.0
Bone marrow	15.7	1	199	~3.60	12.0-24.0
Bone surface	8.11	6	123	~3.32	12.0-24.0
Brain	2.28	12	32.4	~4.17	12.0-24.0
Brown fat	26.5	12	345	~3.31	12.0-24.0
Bulbo-urethral gland	22.6	1	352	~4.07	12.0-24.0
Caecum mucosa	27.2	12	496	9.54	12.0-72.0
Choroid Plexus	8.64	1	93.9	~3.99	12.0-24.0
Epididymis	14.1	6	218	~4.48	12.0-24.0
Epithelial tongue	21.7	12	319	~4.34	12.0-24.0
Exorbital lachrymal gland	23.8	12	346	~3.26	12.0-24.0
Fundic stomach mucosa	23.5	12	381	~4.42	12.0-24.0
Harderian gland	37.4	12	534	9.54	12.0-72.0
Intra-orbital Lachrymal gland	26.0	12	354	~3.37	12.0-24.0
Kidney cortex	63.2	12	967	7.98	12.0-72.0
Kidney medulla	40.7	12	592	~4.99	12.0-24.0
Large intestine mucosa	50.1	24	744	n.c.	n.c.
Lens of the eye	1.01	12	16.2	~7.79	12.0-24.0
Liver	66.8	12	945	30.3	24.0-168
Lung	28.6	12	413	~3.58	12.0-24.0
Mandibular lymph node	23.9	12	320	~3.53	12.0-24.0
Meninges	4.59	1	64.9	~3.33	12.0-24.0
Muscle	14.5	12	199	~3.12	12.0-24.0
Myocardium	25.2	12	380	~3.62	12.0-24.0
Nasal mucosa	10.8	12	164	18.4	12.0-72.0
Non fundic stomach mucosa	478	0.25	1250	8.04	6.00-72.0
Oesophageal wall	25.9	0.25	256	~5.66	12.0-24.0
Pancreas	26.2	12	397	~3.50	12.0-24.0
Pineal body	25.5	12	358	~3.08	12.0-24.0
Pituitary gland	26.1	12	360	~2.97	12.0-24.0
Plasma (LSC)	48.2	12	724	6.50	12.0-72.0
Preputial gland	30.9	1	451	15.3	12.0-72.0
Prostate	18.4	12	308	~8.01	12.0-24.0
Rectum mucosa	51.1	24	683	~8.18	24.0-72.0
Salivary glands	25.5	12	376	~3.48	12.0-24.0
Seminal vesicles	8.98	12	135	~7.34	12.0-24.0
Skin	15.1	12	224	11.6	12.0-72.0
Small intestine mucosa	62.5	0.25	819	~3.16	12.0-24.0
Spinal cord	2.31	12	35.5	~4.56	12.0-24.0
Spleen	28.1	6	357	~3.14	12.0-24.0
Testes	11.3	12	140	~4.40	12.0-24.0
Thymus	25.5	12	331	~3.19	12.0-24.0
Thyroid gland	20.4	12	329	~4.08	12.0-24.0
Tongue	24.3	12	363	~3.68	12.0-24.0
Tooth pulp	21.3	12	327	~3.63	12.0-24.0
Trachea	12.7	1	162	~3.22	12.0-24.0
Urinary bladder wall	541	24	6760	~4.86	24.0-72.0

表 2.6.4.4- 8 雄性 Wistar 系ラットに[^{14}C]ダロルタミドを 100mg/kg の用量で単回経口投与後の臓器・組織中放射能濃度の薬物動態パラメータ（続き）

Organs/tissues	Ceq_{max} [mg-eq/kg]	t_{max} [h]	AUC(0-24) [mg-eq·h/kg]	$t_{1/2}$ [a] [h]	Regression range [h]
Urinary bladder contents	520	12	9470	8.15	12.0-72.0
Uveal tract / retina	18.4	1	208	~3.85	12.0-24.0
White fat	1.79	12	31.2	~7.73	12.0-24.0

a = $t_{1/2}$ should be treated with caution because those values with "~"were determined using an insufficient number of data points (i.e. < 3 in terminal phase)
n.c. = not calculated
Source: 4.2.2.3.5 R-9747

2.6.4.5 代謝

ダロルタミド及び SR 体、SS 体の代謝を、ヒト及び動物の肝細胞を用いて *in vitro* にて検討した。また、ヒトの肝細胞、肝ミクロソーム、細胞画分、異種発現系ヒト代謝酵素（CYP、UGT、AKR など）を用いて、ダロルタミドの代謝に関与する酵素を同定し、酵素阻害作用を明らかにした。*In vivo* における[^{14}C]ダロルタミドを用いた代謝の検討はラット及びヒトにおいて実施した。*In vitro* 及び *in vivo* 試験に基づく推定代謝経路を図 2.6.4.5- 1 に示す。

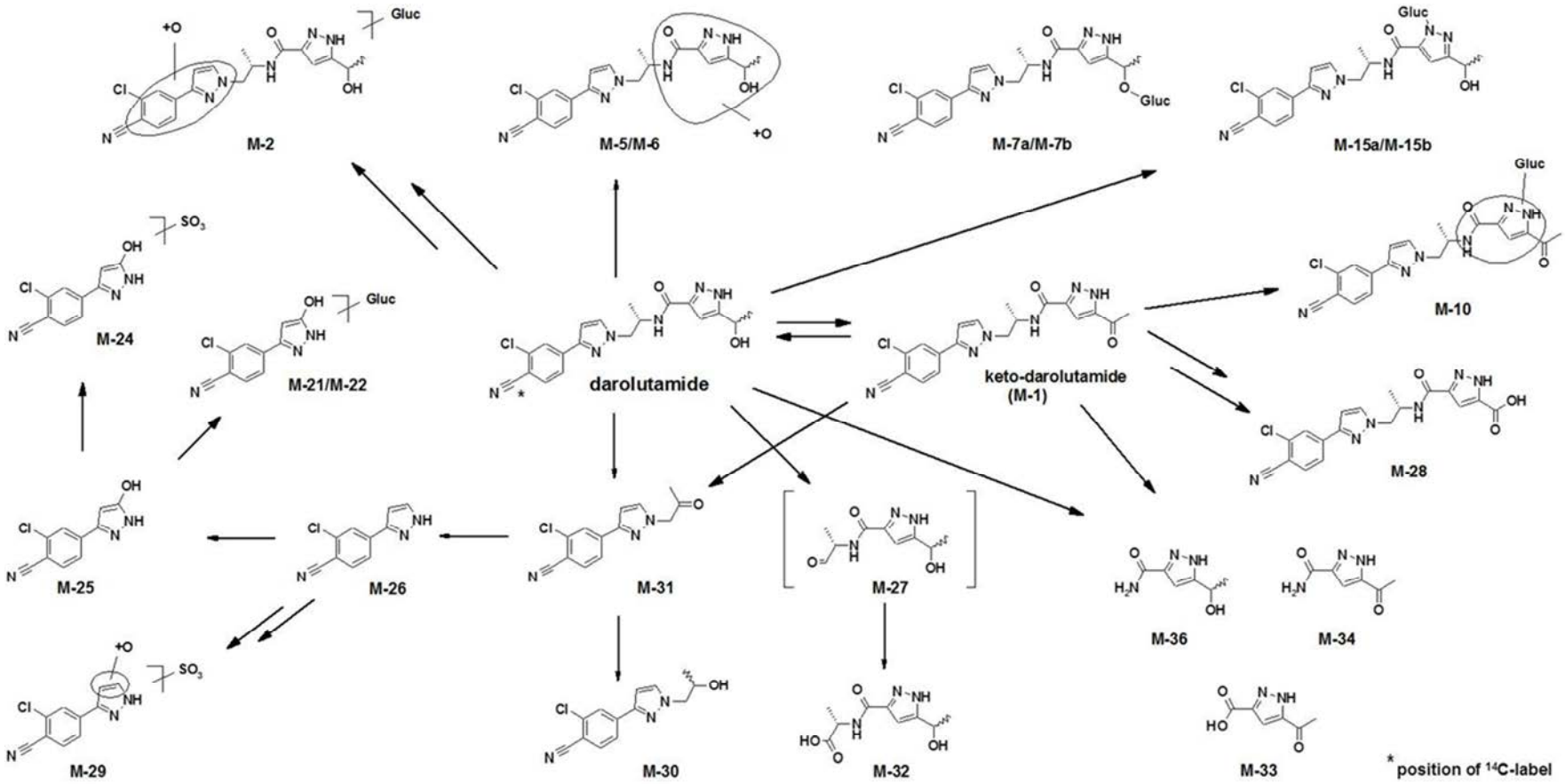


図 2.6.4.5- 1　ヒト及び動物における *in vitro* 及び *in vivo* 試験に基づく推定代謝経路

Source: 4.2.2.4.18 PH-40075

2.6.4.5.1 *In vitro*における代謝

ヒト及び動物の代謝プロファイルを、肝ミクロソーム及び肝細胞を用いて比較した。また、ダロルタミドの代謝に関与するヒトの責任酵素を同定した。代謝物の構造は LC-HRMS 及び LC-MS/MS を用いて推定した。ダロルタミドが、CYP、UGT 及び DPD に対する阻害及び CYP 誘導作用を介して薬物動態学的薬物相互作用を引き起こす可能性についても *in vitro* にて検討した。

上記の試験の多くでは、ダロルタミドと共に SR 体及び SS 体を用いた検討も実施した。

2.6.4.5.1.1 動物種間の比較

ダロルタミドは同様の薬理作用を有する SR 体と SS 体の等量混合物としてヒトに投与される。

ヒト及び毒性試験で使用した動物種におけるダロルタミドの代謝プロファイルを動物種間で比較し、代謝物を同定した。また、代謝物 M-1 を中間体とした SR 体と SS 体の相互変換の可能性について、詳細に検討した。

2.6.4.5.1.1.1 代謝物の同定

参照項目： 4.2.2.4.3 R-9989
4.2.2.4.4 PH-39883

ダロルタミドの代謝物同定試験の概要を表 2.6.4.5- 1 に、ヒト及び動物の肝細胞で産生された代謝物プロファイルを表 2.6.4.5- 2 にそれぞれ示す。

[^{14}C]ダロルタミドをヒト及び非臨床試験で使用した動物の肝細胞と共にインキュベーションした。げっ歯類、イヌ及びヒト肝細胞において産生された最も主要な代謝物は概して M-1 であった。*O*-グルクロン酸抱合体（M-7）はすべての動物種で産生された。そのほかに水酸化及びグルクロン酸抱合を受けた複数の二次代謝物（M-2、M-3、M-4 及び M-8 など）が動物において多く産生されたが、ヒト肝細胞での産生量はわずかであり、これらの代謝物のヒトにおける重要性は低いと考えられた。ヒトの主要な代謝経路（酸化及びグルクロン酸抱合）はげっ歯類及びイヌ肝細胞でも認められた。

表 2.6.4.5- 1 代謝物同定試験の概要

Study type	*In vitro* assays
Bayer reference	4.2.2.4.3 R-9989, 2.6.5.10 Table 10-3
Test system	Hepatocytes of Balb/c mouse, CD-1 mouse, Wistar rat, Beagle dog, and human (three individual donors)
Test compound	[^{14}C]darolutamide
Bayer reference	4.2.2.4.4 PH-39883, 2.6.5.10 Table 10-4
Test system	*in vitro*: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes *in vivo:* human : plasma, feces, urine rat : plasma, urine, feces, bile dog : plasma, urine
Test compound	Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

表 2.6.4.5- 2 各種動物の肝細胞における[^{14}C]ダロルタミドの主要な代謝物（放射能%：インキュベーション 3 時間）

	Species				
	CD-1 mouse (male)	Balb/c mouse (male)	Wistar rat (male)	Beagle dog (male)	Human 3 donors (mean)
Darolutamide	33.2	17.4	39.4	33.1	70.7
M-1,keto-darolutamide	32.1	4.2	27.4	43.6	21.5
M-2, M-3[a]	5.6	12.5	7.2	5.1	0.7
M-7[b]	10.8	29.6	5.3	4.6	3.7
M-4	10.3	20.0	10.1	7.7	2.2
M-8	2.2	5.1	4.1	2.7	0.7

a = Not separated
b = Co-elution with two additional hydroxylated metabolites (M-6, M-5)

2.6.4.5.1.1.2 SR 体と SS 体の相互変換

参照項目： 4.2.2.4.2 R-9988
4.2.2.4.1 R-11056
4.2.2.1.7 R-11021

ヒト及び動物における SR 体及び SS 体の相互変換について検討した試験の概要を表 2.6.4.5-3 に、試験成績を表 2.6.4.5- 4 に示す。

マウス、ラット、サル、イヌ、ミニブタ及びヒトの肝細胞において、出発物質としてダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 を用い、SR 体及び SS 体の相互変換の程度と速度について *in vitro* で検討した。インキュベーションは少なくとも 3 時間にわたって行ったが、SR 体及び SS 体間の相互変換は、二次的な代謝の影響が少ない 30 分間のインキュベーションに基づき評価した。

ダロルタミド添加時には、サル及びイヌの肝細胞で M-1 が顕著に産生されたが、そのほかの動物では M-1 の産生量は比較的少なかった。マウス及びイヌでは SR 体の残存量を考慮すると、M-1 は主に SS 体から産生されることが示唆された。

SR 体添加時において、ヒトとサルでは少量の SS 体への変換が認められた。マウス肝細胞では全体的に SR 体は不安定であった。一方で、SS 体添加時においては、すべての動物で SR 体への明らかな変換は認められなかった。

M-1 添加時において、ヒト肝細胞では、速やかに SR 体又は SS 体に変換されたが、SS 体の産生が明らかに優勢であった。ヒト以外の動物でも M-1 を出発物質とした場合には、SS 体の産生が優勢となる、同様の傾向は認められたものの、ヒトほど顕著な選択性はなかった。

表 2.6.4.5- 3 SR 体と SS 体の相互変換試験の概要

Study type	*In vitro* assays
Bayer reference	4.2.2.4.2 R-9988, 2.6.5.10 Table 10-2 4.2.2.4.1 R-11056, Table 10-1[a]
Test system	Hepatocytes of Balb/c mouse, Wistar rat, Cynomolgus monkey, Beagle dog, Goettingen minipig and human (pool)
Test compound	Darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide, keto-darolutamide

a = data taken from experiment with the suffix -1 and 2 (4.2.2.1.7 R-11021)

表 2.6.4.5- 4 ヒト及び動物の肝細胞における 30 分間のインキュベーション後の SR 体と SS 体の相互変換

Species	Human	Balb/c mouse	Cynomolgus monkey	Goettingen minipig	Beagle dog	Wistar rat
Starting material			**Darolutamide**			
Analyte[a]			**[%]**			
(*S,R*)-darolutamide	43.1	40.1	40.9	47.4	51.9	50.8
(*S,S*)-darolutamide	44.1	28.8	35.8	46.3	22.2	48.0
Keto-darolutamide	4.3	9.3	24.3	4.6	26.8	4.3
Starting material			**Keto-darolutamide**			
Analyte[a]			**[%]**			
(*S,R*)-darolutamide	3.1	3.1	1.0	5.2	0.4	-
(*S,S*)-darolutamide	92.0	5.1	20.6	7.1	5.2	-
Keto-darolutamide	16.2	66.3	66.7	89.2	78.5	-
Starting material			**(*S,R*)-darolutamide**			
Analyte[a]			**[%]**			
(*S,R*)-darolutamide	90.4	76.4	74.3	95.9	92.9	110
(*S,S*)-darolutamide	4.1	0.1	2.4	0.2	0.2	0.0
Keto-darolutamide	1.6	0.7	15.9	0.9	3.4	1.5
Starting material			**(*S,S*)-darolutamide**			
Analyte[a]			**[%]**			
(*S,R*)-darolutamide	0.7	0.7	0.4	0.5	0.4	0.0
(*S,S*)-darolutamide	88.9	63.5	61.1	94.8	33.3	100
Keto-darolutamide	8.0	13.5	28.0	8.0	45.3	9.7

a = analyte detected; % of initial total amount of starting material, values calculated from data provided in Appendix III (4.2.2.4.2. Report R-9988) and Table 7 (4.2.2.1.7 Report R-11021)
- = not performed

2.6.4.5.1.1.3 ダロルタミドの第Ⅰ相代謝酵素に対する基質特性

参照項目： 4.2.2.4.5 PH-40290
4.2.2.4.7 R-9722

ダロルタミドの第 I 相代謝に関与する酵素を同定するための *in vitro* 試験の概要を表 2.6.4.5- 5 に示す。

SR 体及び SS 体の相互変換は M-1 への酸化、引き続く SR 体若しくは SS 体への還元による二段階の反応であった。これらの反応は、膜結合型酵素及びサイトゾールに存在する酵素によって触媒された。

ダロルタミドのヒト血漿中における主要な代謝物 M-1 への酸化は CYP 分子種（主に CYP3A4、わずかに CYP1A1）により触媒され、また、AKR1C3 及びアルコール脱水素酵素（ADH）、カルボニル還元酵素によってもわずかながら触媒された。ダロルタミドを構成する二つのジアステレオマーSR 体及び SS 体は同様の酸化的代謝を受けたが、これらの *in vitro* 試験において、SS 体の酸化的代謝は SR 体よりも速やかであった。

ヒト肝細胞において、M-1 は極めて速やかにダロルタミドに再変換され、SS 体の産生が明らかに優勢であった（表 2.6.4.5- 4）。この還元はサイトゾールに存在する還元酵素によって主に触媒され、主に AKR1C3 が寄与し、AKR1D1 の寄与も認められた。更に、サイトゾールに存在するそのほかの還元酵素及びミクロソーム還元酵素〔カルボニル還元酵素（CBR）及び 11βヒドロキシステロイド脱水素酵素（11ß-HSD）〕もわずかに寄与したが、これらの酵素では AKR1C3 ほどの SS 体優勢な還元反応は認められなかった。M-1 はダロルタミドへの還元に加えて、更なる酸化的

代謝を受けたが、これは主に CYP3A4 によって触媒され、程度は低かったが CYP1A1 によっても触媒された。この酸化的代謝は分子中央のアルキルピラゾール部分が酸化的に開裂するものであった。

ヒトの肝細胞において、ダロルタミドの消失は強い CYP3A4 阻害薬であるイトラコナゾールの存在下で約 30%に減少した。これはイトラコナゾールの併用によりダロルタミドの AUC が 1.75 倍に増加した臨床薬物相互作用試験の成績（2.7.2.2.4.2.2）と一致するものであった。

以上、複雑な酸化と還元の組み合わせによって、ダロルタミド及び M-1 は酸化的代謝物の前駆体プールとして働くと考えられた。

更なる重要な消失経路であるダロルタミドのグルクロン酸抱合については 2.6.4.5.1.1.4 に示す。

表 2.6.4.5- 5　ダロルタミドの代謝酵素同定試験の概要

Study type	*In vitro* assay, Phase I metabolizing enzymes involved
Bayer reference	4.2.2.4.5 PH-40290, 2.6.5.10 Table 10-15 and Table 10-16 4.2.2.4.7 R-9722, 2.6.5.10 Table 10-9 to Table 10-14
Test system	Human hepatocytes (single donors), Human liver cytosol (pool), Human liver microsomes (pool), Heterologously expressed human enzymes (CYP isoforms, AKR isoforms, CBR, HSDs)
Test compound	[^{14}C]darolutamide, darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide, keto-darolutamide

2.6.4.5.1.1.4　ダロルタミドの UGT 分子種に対する基質特性

参照項目： 4.2.2.4.6　PH-40077

ダロルタミドのグルクロン酸抱合に関与する酵素を同定するための *in vitro* 試験の概要を表 2.6.4.5- 6 に示す。ダロルタミド、SR 体及び SS 体のグルクロン酸抱合を 13 種類の組換え UGT 分子種を用いて検討した。

ダロルタミドのグルクロン酸抱合体は、SS 体の立体化学構造を有する場合には代謝物名の末尾に「a」を、SR 体の立体化学構造を有する場合には「b」を付した。

O-グルクロン酸抱合体 M-7a 及び M-7b の産生は主に UGT1A9、次いで UGT1A8、UGT2B17、UGT1A3、及び UGT1A1 により触媒された。*N*-グルクロン酸抱合体 M-15a 及び M-15b は UGT2B10 のみにより触媒された。SR 体及び SS 体を用いた検討結果は、ダロルタミドを用いた場合とよく一致した。

ダロルタミドのグルクロン酸抱合は、ウリジン二リン酸グルクロン酸（UDPGA）を添加したヒト肝、腸、腎ミクロソームにおいて産生された。肝ミクロソームでは、それぞれ SS 体の *O*-グルクロン酸抱合体 M-7a 及び *N*-グルクロン酸抱合体 M-15a の産生が優勢であり、SR 体の *O*-グルクロン酸抱合体 M-7b 及び *N*-グルクロン酸抱合体 M-15b の産生は少なかった。腎及び腸ミクロソームでは SS 体の *O*-グルクロン酸抱合体である M-7a が主に産生され、グルクロン酸抱合体 M-7b、M-15a 及び M-15b の産生は極めて少なかった。

ヒト肝ミクロソームにおけるダロルタミドからの M-7a 及び M-7b の産生は、UGT 分子種選択的阻害薬アタザナビル（10μM：UGT1A1 及び UGT1A3）及びニフルム酸（10μM：UGT1A9）によって部分阻害を受けた。これらの阻害薬を同時に用いると、M-7a 及び M-7b の産生はそれぞれ対照群に対して約 73%及び 80%の減少が認められた。

N-グルクロン酸抱合体 M-15a 及び M-15b の産生は、UGT2B10 の選択的阻害薬デスロラタジンによって、対照群に対してそれぞれ 79%及び 62%の減少が認められた。また、M-15a 及び M-15b の産生は、UGT2B10 によって選択的にグルクロン酸抱合を受ける levomedetomidine のグルクロン酸抱合と高い相関（r^2＝0.83 及び r^2＝0.84）が認められた（単一ドナー由来 N＝22 及び HLM プール N＝2）。

結論として M-7a 及び M-7b を産生するダロルタミドの *O*-グルクロン酸抱合は主に UGT1A9、UGT1A1、UGT1A3 により触媒されることが示唆された。M-15 を産生する *N*-グルクロン酸抱合は主に UGT2B10 により触媒された。

ダロルタミドは複数の経路により消失することから、強力な UGT 阻害薬又は誘導薬と併用した場合においても、ダロルタミドの曝露量に顕著な変化が生じる可能性は低いと考えられた。

表 2.6.4.5- 6　UGT 分子種同定試験の概要

Study type	*In vitro* assay, UGT enzymes involved
Bayer reference	4.2.2.4.6 PH-40077, 2.6.5.10 Table 10-5 to 10-8
Test system	Human liver (pool and single donor), intestinal (pool), renal microsomes (pool); Recombinant UGT isoforms (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B10, 2B15 and 2B17)
Test compound	Darolutamide, (*S,R*)-darolutamide, (*S,S*)-darolutamide

2.6.4.5.1.2　ダロルタミドの CYP 分子種に対する阻害作用

参照項目：　4.2.2.4.8　R-9943
4.2.2.4.10　PH-39981
4.2.2.4.12　PH-39984

ダロルタミド、SR 体及び SS 体の CYP 阻害作用試験の概要を表 2.6.4.5- 7 に、結果をそれぞれ表 2.6.4.5- 8、表 2.6.4.5- 9 及び表 2.6.4.5- 10 に示す。

ダロルタミド、SR 体又は SS 体は、CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C19、2D6、2E1、2J2 及び 3A4 の標準基質に対する酵素活性をわずかに阻害するか、又は阻害しなかった。*In vitro* にて最も低い IC_{50} 値は SR 体による CYP2C9（22.6 μM）に対する阻害において認められた。

最も強い阻害作用を示した CYP2C9 について、米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）から提唱されている静的薬物速度論モデルにてダロルタミド 600mg 投与時の阻害作用を検討した。ダロルタミド（表 2.6.4.5- 8）に加えて M-1（表 2.6.4.8- 11）の *in vitro* 阻害作用を加味した。ダロルタミドの吸収速度定数 k_a として 0.686h^{-1}（=0.011min^{-1}）を用いた（5.3.3.5.2　PH-38472）。完全な吸収を仮定して F_a は 1 を、ダロルタミドの $C_{max,u}$ は約 0.7 μM、M-1 の　$C_{max,u}$ は約 0.04 μM を用い、基質薬物として S-ワーファリンを想定した結果、AUCR は 1.25 未満と予測された。したがって、ダロルタミド及び M-1 が CYP 分子種に対する阻害作用を介して臨床的に問題となる薬物動態学的相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

表 2.6.4.5- 7 CYP 阻害試験の概要

Study type	*In vitro* assay, CYP inhibition
Bayer reference	4.2.2.4.8 R-9943, 2.6.5.12 Table 12-1 4.2.2.4.10 PH-39981, 2.6.5.12 Table 12-3 4.2.2.4.12 PH-39984, 2.6.5.12 Table 12-5, Table 12-6
Test system	Human liver microsomes (pool); recombinant CYP2J2
Test compound	Darolutamide, (*S,R*)-darolutamide , (*S,S*)-darolutamide

表 2.6.4.5- 8 ダロルタミドの CYP 阻害作用

CYP isoform	**Substrate**	**Enzyme source**	IC_{50} **[μM]**
1A2	Phenacetin	Human liver microsomes	> 100
2A6	Coumarin	Human liver microsomes	> 100
2B6	Bupropion	Human liver microsomes	> 100
2C8	Paclitaxel	Human liver microsomes	> 100
2C9	Diclofenac	Human liver microsomes	30.3
2C19	*S*-Mephenytoin	Human liver microsomes	64.1
2D6	Bufuralol	Human liver microsomes	81.9
2E1	Chlorzoxazone	Human liver microsomes	n.i.
3A4	Midazolam	Human liver microsomes	> 100
	Midazolam	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 100
3A4	Testosterone	Human liver microsomes	> 100
	Testosterone	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 100

n.i. = no inhibition within tested concentration range

表 2.6.4.5- 9 SR 体の CYP 阻害作用

CYP isoform	**Substrate**	**Enzyme source**	**IC_{50} [μM]**
1A2	Phenacetin	Human liver microsomes	> 50
2A6	Coumarin	Human liver microsomes	> 50
2B6	Bupropion	Human liver microsomes	> 50
2C8	Amodiaquine	Human liver microsomes	36.2
2C9	Diclofenac	Human liver microsomes	22.6
2C19	*S*-Mephenytoin	Human liver microsomes	46.7
2D6	Dextromethorphan	Human liver microsomes	> 50
2E1	Chlorzoxazone	Human liver microsomes	> 50
2J2	Ebastine	Recombinant CYP2J2	> 50
3A4	Midazolam	Human liver microsomes	> 50
	Midazolam	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 50
3A4	Testosterone	Human liver microsomes	> 50
	Testosterone	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 50

表 2.6.4.5- 10　SS 体の CYP 阻害作用

CYP isoform	Substrate	Enzyme source	IC_{50} [μM]
1A2	Phenacetin	Human liver microsomes	> 50
2A6	Coumarin	Human liver microsomes	> 50
2B6	Bupropion	Human liver microsomes	> 50
2C8	Amodiaquine	Human liver microsomes	46.3
2C9	Diclofenac	Human liver microsomes	> 50
2C19	*S*-Mephenytoin	Human liver microsomes	> 50
2D6	Dextromethorphan	Human liver microsomes	40.2
2E1	Chlorzoxazone	Human liver microsomes	> 50
2J2	Ebastine	Recombinant CYP2J2	> 50
3A4	Midazolam	Human liver microsomes	> 50
	Midazolam	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 50
3A4	Testosterone	Human liver microsomes	> 50
	Testosterone	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 50

2.6.4.5.1.3　ダロルタミドの UGT 分子種に対する阻害作用

参照項目：　4.2.2.4.13　R-11222

SR 体及び SS 体のヒト UGT 分子種に対する阻害作用を検討した試験の概要を表 2.6.4.5- 11 に、試験成績を表 2.6.4.5- 12 に示す。主要なヒトグルクロン酸転移酵素 UGT1A1、1A4、1A6、1A9、及び 2B7 に対する IC_{50} 値を算出した。

グルクロン酸抱合の阻害作用について検討した結果、SR 体は UGT1A9 及び 1A1 の両分子種に対して阻害作用を示し、UGT1A9 に対する阻害作用の方がより強く IC_{50} 値は 12.5μM、K_i 値は 6.32μM であり、UGT1A1 に対する IC_{50} 値は 26.5μM であった。SR 体は UGT1A4、1A6 及び 2B7 の活性に対して検討した最高濃度まで明らかな影響を示さなかった。SS 体は UGT1A1 に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 31.7μM であった。SS 体は UGT1A4、1A6、1A9 及び 2B7 によるグルクロン酸抱合に対して明らかな阻害作用を示さなかった（表 2.6.4.5- 12）。

結論として、治療量における血漿中非結合型薬物濃度が低い（SR 体及び SS 体の合計で 0.7μM 未満）ことから、UGT1A1 及び 1A9 を含む UGT 分子種によって主に代謝される薬物を併用しても、臨床的に問題となる薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

表 2.6.4.5- 11　SR 体及び SS 体の UGT 阻害試験の概要

Study type	*In vitro* assay, UGT inhibition
Bayer reference	4.2.2.4.13 R-11222, 2.6.5.12 Table 12-7
Test system	Human liver microsomes (pools)
Test compound	(*S,R*)-darolutamide, (*S,S*)-darolutamide

表 2.6.4.5- 12 ヒト肝ミクロソーム（プール）における UGT 分子種阻害作用（IC_{50} 値：インキュベーション n=2 の平均値、K_i 値：インキュベーション n=3 の平均値）

UGT Isoform	Substrate / Product	(*S*,*R*)-darolutamide		(*S*,*S*)-darolutamide	
		IC_{50} [µM]	K_i [µM]	IC_{50} [µM]	K_i [µM]
1A1	Estradiol / Estradiol 3-glucuronide	26.5	n.d.	31.7	n.d.
1A4	Trifluoperazine / Trifluoperazine *N*-glucuronide	>100	n.d.	>100	n.d.
1A6	Serotonin / Serotonin glucuronide	>100	n.d.	>100	n.d.
1A9	Propofol / Propofol-*O*-glucuronide	12.5	6.32[a]	>100	n.d.
2B7	AZT / AZT 5'- glucuronide	>100	n.d.	>100	n.d.

a = competitive inhibition
AZT = 3'-azido-3'-deoxythyimidine
n.d.= not determined

2.6.4.5.1.4 ダロルタミドの DPD に対する阻害作用

参照項目： 4.2.2.4.14 PH-40239

SR 体及び SS 体の DPD に対する阻害試験の概要を表 2.6.4.5- 13 に示す。

DPD は、最も多く使用される抗がん剤の 1 つ、5-フルオロウラシルの血漿中及び組織中濃度に影響する重要な酵素であることが知られている。DPD はヒト肝サイトゾールに存在し、ピリミジン異化の律速酵素である。ヒト肝サイトゾールを用い、5-フルオロウラシルからの代謝物 5-フルオロジヒドロウラシル産生に対する SR 体及び SS 体の阻害作用について検討した。

SR 体及び SS 体のいずれも *in vitro* での 5-フルオロウラシルの代謝に影響を及ぼさず、IC_{50} 値は 50µM を超えていた。陽性対照として添加した 5-ブロモウラシルは、5-フルオロウラシル代謝を明らかに阻害した。

以上の *in vitro* 試験成績より、ダロルタミドが *in vivo* にてジヒドロピリミジン脱水素酵素による 5-フルオロウラシルの代謝を阻害する可能性は低いと考えられた。

表 2.6.4.5- 13 ヒト肝サイトゾールにおける SR 体及び SS 体の DPD 阻害試験の概要

Study type	*In vitro* assay, DPD inhibition
Bayer reference	4.2.2.4.14 PH-40239, 2.6.5.12 Table 12-8
Test system	Human liver cytosol (pool)
Test compound	(*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide

2.6.4.5.1.5 ダロルタミドの CYP 分子種に対する誘導作用

参照項目： 4.2.2.4.15 PH-40105

ダロルタミド、SR 体及び SS 体の CYP 誘導作用に関する試験の概要を表 2.6.4.5- 14 に、試験成績を表 2.6.4.5- 15 に示す。検討に用いたヒト初代培養肝細胞は、3 名のドナーから個別に調製した。

いずれの肝細胞においても、ダロルタミド、SR 体及び SS 体は、最高濃度 10mg/L まで CYP1A2 及び CYP2B6 の mRNA レベル及び酵素活性レベルに対して顕著な影響を示さなかった（E_{max} は 2 倍未満）。

しかしながら、ダロルタミド、SR 体及び SS 体は、すべてのドナー由来の肝細胞において、濃度依存的に CYP3A4 を mRNA レベルで誘導した。ダロルタミドは最も感受性の高いドナーで最大 9.9 倍の誘導作用を示した（リファンピシンによる誘導の 24%）。SR 体及び SS 体はそれぞれ最大 10 倍（リファンピシンの 24%）及び 13 倍（リファンピシンの 32%）であった。CYP3A4 に対する誘導作用は酵素活性レベルでも濃度依存的に認められ、ダロルタミドは最大で 5.3 倍に誘導した（リファンピシンによる誘導の 28%）。

臨床における CYP3A4 誘導の可能性を評価するため、ヒト肝細胞における *in vitro* 誘導試験の結果、及び反復投与後の臨床曝露量データ（ダロルタミド 600mg を 1 日 2 回投与後の定常状態、2.7.2.3.2.1.2）を用いて Relative induction score（RIS）を算出し、ダロルタミド、SR 体及び SS 体の CYP3A4 誘導による薬物相互作用の可能性を検討した。

このモデルに基づく予測によると、ダロルタミド、SR 体及び SS 体は CYP3A4 の指標基質薬ミダゾラムに対して中等度から強い誘導作用を示し、ミダゾラムの AUC を最大で 84%、SR 体では最大で 71%、SS 体では最大で 83%減少させると考えられた。

表 2.6.4.5- 14 CYP 誘導試験の概要

Study type	*In vitro* assay, induction of CYP1A2, CYP3A4 and CYP2B6
Bayer reference	4.2.2.4.15 PH-40105, 2.6.5.12 Table 12-9 and Table 12-10
Test system	Cultured human hepatocytes (3 donors)
Test compound	Darolutamide, (*S,R*)-darolutamide, (*S,S*)-darolutamide (5-10000 µg/L)

表 2.6.4.5- 15 CYP 分子種に対する誘導作用

CYP	**Result for darolutamide, (*S,R*)-darolutamide, (*S,S*)-darolutamide**
1A2 (mRNA/activity)	No induction up to 10000 µg/L
2B6 (mRNA/activity)	No induction up to 10000 µg/L
3A4 (mRNA/activity)	Conc.-dependent induction up to 13-fold

2.6.4.5.2 *In vivo* における代謝

参照項目： 4.2.2.5.1 R-9663
4.2.2.4.16 R-9727
4.2.2.4.17 PH-39959
4.2.2.4.18 PH-40075
5.3.1.1.2 R-11003

ダロルタミドのラット及びヒトにおける *in vivo* 代謝試験の概要を表 2.6.4.5- 16 及び表 2.6.4.5- 17 にそれぞれ示した。更に、ラット、イヌ及びヒトにおける SR 体と SS 体の血漿中の存在比の変動を検討した試験の概要をそれぞれ表 2.6.4.3- 1、表 2.6.4.3- 2 及び表 2.6.4.5- 17 に示す。

表 2.6.4.5- 16 ラットにおける *in vivo* 代謝試験の概要

Study type	*In vivo*		
Bayer reference	4.2.2.5.1 R-9663, 2.6.5.3 Table 3-2, 2.6.5.13 Table 13-1 4.2.2.4.16 R-9727, 2.6.5.9 Table 9-1 to Table 9-3		
Test system	Rat: 2 male / time point for plasma or 4 male / time point for excreta, strain: Wistar		
,Dosage	[^{14}C]darolutamide[a]	:	target: 10 mg/kg, actual: 11.1 mg/kg[c] po or 10.85 mg/kg[d] po target: 10 mg/kg, actual: 6.38 mg/kg[e] iv
Vehicle	po administration	:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (5%) 10 mg/mL, 1 mL/kg, gastric gavage
	iv administration	:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (5%) 10 mg/mL, 1 mL/kg, bolus injection
Matrices	plasma, urine, feces		
Bayer reference	4.2.2.4.17 PH-39959, 2.6.5.9 Table 9-4 to Table 9-6		
Test system	Rat BDC	:	5 male / dose group, strain: Wistar
Dosage	[^{14}C]darolutamide[b]	:	2 mg/kg po 2 mg/kg iv
Vehicle	po administration	:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (5%) 2 mg/mL, 1 mL/kg, gastric gavage
	iv administration	:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (5%) 2 mg/mL, 1 mL/kg, bolus injection
Matrices	bile, urine, feces, GIT		

a = specific activity: 3.33 MBq/mg
b = specific activity: 2.60 or 2.65 MBq/mg
c = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 1
d = 4.2.2.4.16 R-9727
e = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 2

表 2.6.4.5- 17 ヒトにおける *in vivo* 代謝試験の概要

Study type	Single dose pharmacokinetics, *in vivo* study		
Bayer reference	4.2.2.4.18 PH-40075, 2.6.5.9 Table 9-7 and Table 9-8 5.3.1.1.2 R-11003		
Test system	Human, 6 males		
Dosage	[^{14}C]darolutamide[a]	:	300 mg/volunteer (po)
Vehicle	80% Macrogol 4000, 20% water (w/w)		
Matrices	plasma, urine, feces		

a = radioactivity administered: 5.43 MBq/volunteer

ラット及びヒト血漿中の代謝物組成を表 2.6.4.5- 18 に示す。

表 2.6.4.5- 18 [^{14}C]ダロルタミドを単回経口投与後の血漿中放射能組成

Species	**Rat**	**Human**
Target dose	10 mg/kg[a]	300 mg[a]
Component	% of AUC (total radioactivity)	
Darolutamide	49.9	28.6
(*S*,*R*)-darolutamide	n.a.	4.46
(*S*,*S*)-darolutamide	n.a.	24.1
Keto-darolutamide (M-1)	48.6	58.8

a = target: 10 mg/kg / actual: 10.85 mg/kg, mean 302 mg/volunteer
n.a.=not applicable
Source:4.2.2.4.16 R-9727, 5.3.1.1.2 R-11003

ダロルタミドをラット及びヒトに単回経口投与したとき、血漿中の主要代謝物は活性代謝物 M-1 のみであり、M-1 の AUC が総放射能 AUC に占める割合はラットで 48.6%、ヒトで 58.8%であった（表 2.6.4.5- 18）。親化合物ダロルタミドの AUC が総放射能 AUC に占める割合はラットで 49.9%、ヒトで 28.6%であった。そのほかの血漿中代謝物としては、親化合物のグルクロン酸抱合体及び酸化代謝物が痕跡程度に検出されたに過ぎず、全身曝露に対して明らかな寄与はなかった。M-1 はダロルタミド投与後のマウス（表 2.6.4.3- 20）及びイヌ血漿中（表 2.6.4.3- 8）においても検出された。

ラット血漿におけるダロルタミドの定性的代謝物プロファイル及び全体的な代謝経路は、ヒト血漿とかなり類似したものと考えられた。

表 2.6.4.5- 19 [14C]ダロルタミドを単回投与後の排泄物中放射能組成

Species	**Rat**	**BDC-Rat**	**Human**
Route	**po**	**iv**	**po**
Dose	**10 mg/kg[a]**	**2 mg/kg**	**300 mg[a]**
Sampling interval	**0-96 h[b]**	**0-24 h**	**0-168 h**
Components		**% of dose**	
Urine	30.3	23.4	63.4
Darolutamide	2.2	0.782	6.68[g]
M-24	16.0[c]	16.1	4.21
M-7	3.9[d]	n.a.	25.5[e]
M-15	n.a.	n.a.	5.75 [f]
M-29	n.a.	4.27	6.17
Feces	62.7	12.8	32.4
Darolutamide	41.4	12.6	30.3[h]
M-1	9.0	0.171	0.566
Bile	n.a.	52.5	n.a.
Darolutamide	n.a.	7.83	n.a.
M-1	n.a.	0.133	n.a.
M-7	n.a.	6.43	n.a.
M-10	n.a.	11.2	n.a.
M-15	n.a.	2.35	n.a.
M-28	n.a.	9.55	n.a.
M-29	n.a.	2.69	n.a.
GIT	n.a.	7.06	n.a.
Darolutamide	n.a.	6.72	n.a.
M-1	n.a.	0.111	n.a.

a = actual dose; rat 11.1 mg/kg, human 302 mg
b = feces from 0-48 h
c = slightly contaminated by M-2 in intact rat study
d = contaminated with other glucuronides in rat study
e = 23.8% of dose M-7a, 1.75% of dose M-7b
f = 5.07% of dose M-15a, 0.684% of dose M-15b
g = ratio of (*S*,*S*)-darolutamide over (*S*,*R*)-darolutamide 4:1
h = ratio of (*S*,*S*)-darolutamide over (*S*,*R*)-darolutamide 7:1
n.a. = not applicable
Source:4.2.2.5.1 R-9663, 4.2.2.4.17 PH-39959, 5.3.1.1.2 R-11003

ラットに[14C]ダロルタミドを投与したとき、放射能は主に胆汁／糞を介して排泄された（約63%、表 2.6.4.5- 19）。一方、ヒトでは胆汁／糞を介する排泄経路の重要性は相対的に低く（投与量の約 30%）、尿中排泄（約 63%）が多かった（表 2.6.4.5- 19）。

ラット及びヒトに放射性標識体を投与した試験成績（表 2.6.4.5- 19）より、ダロルタミドには、独立した複数の代謝性及び非代謝性の消失経路が認められた。ラットでは、（BDC ラットに）静脈内投与後、親化合物として胆汁中に投与量の約 8%が排泄された。更に、親化合物は消化管分泌によって糞中及び消化管に相当量（投与量の約 19%）が回収された。放射能の大半は酸化的代謝物として排泄され、静脈内投与後では 57%、経口投与後では 41%が尿糞中に回収された。また、BDC ラット胆汁中には、親化合物のグルクロン酸抱合体として投与量の約 9%に相当する放射能が排泄されたが、これも重要な消失経路のひとつであった。ヒトでは、糞中に親化合物として約 30%の排泄が認められた。尿中には親化合物として投与量の約 7%が排泄されたが、SR 体及び SS 体の割合はそれぞれの血漿中濃度とよく相関しており、尿中への排泄が受動的な糸球体濾過によってのみ起こることが示唆された。加えて、ヒト尿中ではグルクロン酸抱合体が最も多く存在し、*O*-グルクロン酸抱合体 M-7 は約 26%、*N*-グルクロン酸抱合体 M-15 は約 6%排泄された。グルクロン酸抱合体の中では M-7a が大きな割合を占め（約 24%）、これは *in vitro* で

の試験成績とよく一致した（2.6.4.5.1.1.4）。更に、ヒトでは酸化的開裂も重要な経路であり、放射性標識の残存する脱アルキル化代謝物（M-21、M-22、M-24 及び M-29）が投与量の 17.4%認められた（2.6.5.9 Table 9-8）。開裂によって産生された放射性標識を伴わない代謝物（M-32、M-33、M-34 及び M-36）は尿中に投与量の 27%排出され、放射性標識の残存する代謝物の排泄量とおおむね整合するものであった（4.2.2.4.18　PH-40075）。

ラット及びヒト糞中放射能の主成分は親化合物のダロルタミドであった。しかしながら、糞中の親化合物の一部分は腸内細菌叢によってグルクロン酸が脱抱合して生じた可能性がある。概して、ラット及びヒトでは投与量の約 3 分の 2 が代謝によって消失した。M-1 は血漿中の主要代謝物ではあったが、ダロルタミドの消失に対する寄与は小さいと考えられた。

2.6.4.6　排泄

2.6.4.6.1　ラット

参照項目：4.2.2.5.1　R-9663
4.2.2.4.17 PH-39959

ラットにおける単回投与排泄試験の概要を表 2.6.4.5- 16 に示す。

無処置ラットに[^{14}C]ダロルタミドを経口投与（11.1mg/kg）及び静脈内投与（6.38mg/kg）したとき、いずれの投与経路でも放射能は主に胆汁／糞を介して排泄された。投与 168 時間後までの糞中排泄率は経口投与及び静脈内投与でそれぞれ約 64%及び約 61%、尿中排泄率はいずれも約 30%であった。BDC ラットに静脈内投与（2mg/kg）したとき、投与 24 時間後までに消化管及び糞中より回収された放射能は 19.9%であり、相当量の胆汁外排泄（消化管分泌）が認められた（**表** 2.6.4.6- 1）。

放射能の排泄は比較的速やかであり、静脈内投与 48 時間後までにはほぼ排泄は完了し、投与 168 時間後には放射能の 98%が回収された。投与 168 時間後の屍体中に認められた放射能はごくわずかであった。静脈内投与後 2 日間の呼気中には放射能は検出されなかった。

無処置ラットの排泄物中の代謝物組成に投与経路及び時間による明らかな差異は認められなかった。

表 2.6.4.6- 1　ラットにおける[^{14}C]ダロルタミド投与後の排泄率（%）

Route / time [h]	Dose [mg/kg]	Urine	Bile	Feces	GIT	Residues	Recovery[b]
iv / 168	6.38	32.5	n.a.	61.1	n.a.	0.9[a]	97.3
po / 168	11.1	30.4	n.a.	64.2	n.a.	0.7[a]	99.7
iv BDC / 24	2.0	23.4	52.5	12.8	7.06	1.24[c]	100
po BDC / 24	2.0	16.7	44.0	6.46	23.7	3.43[c]	97.2

a = total body including gastrointestinal tract
b = recovery calculated including cage wash
c = total body excluding gastrointestinal tract
BDC = Bile duct cannulated
n.a.= not applicable
Source: 4.2.2.5.1 R-9663; 4.2.2.4.17 PH-39959

2.6.4.6.2　ヒト

参照項目： 4.2.2.4.18　PH-40075

ヒトにおける単回投与排泄試験の概要を表 2.6.4.5- 17 に示す。

臨床第Ⅰ相試験において、6 例の健康男性被験者に[^{14}C]ダロルタミドを 300mg（5.43MBq）単回経口投与して、ヒトにおける薬物動態、代謝及び排泄を検討した。

放射能は被験者の体内から速やかに排泄され、被験者間のばらつきは比較的小さく、排泄物の回収期間終了時の投与 168 時間までに平均で 95.9%（範囲 92.6%～98.1%）が回収された。放射能の尿中排泄率 63.4%（範囲 59.5%～68.9%）に対して、糞便中排泄率は 32.4%（範囲 28.8%～35.9%）であり糞便中排泄は尿中排泄と比べると少なかった。

表 2.6.4.6- 2　ヒトにおける[^{14}C]ダロルタミドを液剤として経口投与後の放射能の排泄（算術平均値）

Route / time [h]	Dose [mg/volunteer]	Urine [%]	Feces [%]	Recovery [%]
po / 168	300[a]	63.4	32.4	95.9

a = actual dose 302 mg/volunteer
Source: 4.2.2.4.18 PH-40075

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

ダロルタミドの代謝を介する薬物相互作用の可能性については 2.6.4.5.1 に、トランスポーターを介する薬物相互作用の可能性については 2.6.4.8 に記載した。血漿中の主要代謝物 M-1 の代謝を介する薬物相互作用の可能性及びトランスポーターを介する薬物相互作用の可能性については 2.6.4.8.6 に記載した。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

ダロルタミド及び M-1 の膜透過性と、主要な排出及び取り込みトランスポーターに対する基質特性及び阻害作用について適切なガイドライン[3,4]に従い検討した。

2.6.4.8.1　Caco-2 細胞を用いたダロルタミドの膜透過性の検討

参照項目：4.2.2.7.3　R-12064
4.2.2.7.1　R-12272
4.2.2.7.2　R-12277

ダロルタミドの膜透過性について、Caco-2 細胞の単層培養膜を用いて *in vitro* で評価した（表 2.6.4.8- 1）。生物薬剤学分類システム（BCS）の膜透過性評価要件を満たすために、ダロルタミド 5～6000μM の濃度を選択した。検討した最高濃度の 6000μM は、臨床投与量のダロルタミド 600mg を 250mL に溶解したときの濃度に相当する（4.2.2.7.3 R-12064）。培地中への溶解度は 60μM が限度であったため、それ以上の濃度では懸濁液の状態で添加した。

ダロルタミドの膜透過性の試験成績を表 2.6.4.8- 2 に示す。

ダロルタミド 5～60μM の濃度範囲において、Caco-2 細胞の頂端膜（A）から基底膜（B）方向へのみかけの透過係数 $P_{app,A-B}$ は 71.3±10.0nm/s（5μM）から 160±11.3nm/s（60μM）の範囲であった。懸濁液を用いた高濃度の場合にも $P_{app,A-B}$ はこの範囲内であった。ダロルタミド 5～60μM の濃度範囲で比較すると、基底膜から頂端膜方向への $P_{app,B-A}$ は $P_{app,A-B}$ より高く、440±37.5nm/s（5μM）から 343±16.6nm/s（60μM）の範囲であり、排出比は 6.17 から 2.14 であった。この排出比はダロルタミドが基底膜から頂端膜方向に能動的に排出されていることを示すと共に、排出比が試験濃度の上昇に伴い減少していることから、輸送過程の飽和を示すものであった。別試験でミノキシジル及びアテノロールと比較したとき、ダロルタミドは 5μM において膜透過性の低い化合物に分類されたものの、透過性パラメータとしては膜透過性の高いミノキシジルと近似していた。30～6000μM の濃度では膜透過性の高い化合物に分類された（4.2.2.7.3 R-12064）。

更に、SR 体及び SS 体の膜透過性についても、Caco-2 細胞の単層培養膜を用いて *in vitro* で比較した（表 2.6.4.8- 1）。5μM の濃度において、SR 体及び SS 体の $P_{app,A-B}$ はそれぞれ 31.9nm/s 及び 64.5nm/s であった。反対方向の $P_{app,B-A}$ は SR 体で 400nm/s、SS 体で 371nm/s であり、排出比はそれぞれ 13 及び 5.8 であった。ダロルタミド 5μM を用いた対照群では、$P_{app,A-B}$ は 60.0nm/s、$P_{app,B-A}$ は 486nm/s であり、排出比は 8.1 であった。細胞アッセイ系におけるばらつきを考慮すると、SR 体と SS 体の膜透過性に明らかな差異はないと考えられた（2.6.5.16　Table 16-2、Table 16-3）。

表 2.6.4.8- 1　膜透過性試験の概要

Study type	*in vitro* assay, permeability
Bayer reference	4.2.2.7.3 R-12064, 2.6.5.16 Table 16-1 4.2.2.7.1 R-12272, 2.6.5.16 Table 16-2 4.2.2.7.2 R-12277, 2.6.5.16 Table 16-3
Test system	Caco-2 cells
Probe Substrates	Minoxidil 10 µM, Atenolol 100 µM
Test compound	Darolutamide: 5 – 6000 µM, (*S*,*R*)-darolutamide: 5 µM, (*S*,*S*)-darolutamide: 5 µM

表 2.6.4.8- 2 Caco-2 細胞におけるダロルタミドの膜透過性

Compound	Concentration	P_{app} A-B		P_{app} B-A		Efflux ratio
		Mean	SD	Mean	SD	Mean
	[μM]	[nm/s]	[nm/s]	[nm/s]	[nm/s]	
Darolutamide	5	71.3[c]	10.0[c]	440	37.5	6.17
Darolutamide	30	102	8.46	346	40.8	3.38
Darolutamide	60	160	11.3	343	16.6	2.14
Darolutamide[a]	600	118	19.0	290	28.6	2.47
Darolutamide[a]	6000	148[c]	6.97	288	22.8	1.95
Darolutamide[b]	5	58.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Atenolol[b]	100	2.65	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Minoxidil[b]	10	65.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

a = A suspension was used in the assay at concentrations exceeding the solubility limit of darolutamide (60 μM). P_{app} then was calculated assuming the maximum soluble concentration to be available in the donor compartment.
b = Separate unidirectional experiment for direct comparison of the A-to-B permeability of darolutamide at 5 μM with low (atenolol) and high (minoxidil) permeable reference compounds. At higher test concentrations, the permeability of darolutamide did exceed that of minoxidil.
c = one replicate was excluded
n.a. = not applicable
Source: 4.2.2.7.3 R-12064

2.6.4.8.2 ダロルタミドの排出トランスポーターにおける基質特性

参照項目： 4.2.2.7.4 R-9662
4.2.2.7.6 R-11872

ダロルタミドの P-gp 及び BCRP に対する基質特性を検討した試験概要を表 2.6.4.8- 3 に示す。

Caco-2 細胞（野生型）、CPT-P1 細胞（P-gp 低発現）及び CPT-B1 細胞（BCRP 低発現）、更に BCRP-MDCK 細胞を用いてダロルタミドの輸送試験を実施し、典型基質と比較した。試験成績は 2.6.5.16 Table 16-4 及び Table 16-8 に示す。

P-gp 及び BCRP 両方を発現する野生型 Caco-2 細胞では、ダロルタミド濃度 2μM における排出比は 98 であった。CPT-P1 及び CPT-B1 細胞では、排出比はそれぞれ 3.6 及び 36 に減少したことから、ダロルタミドは P-gp 及び BCRP の両方により排出され、P-gp の方が BCRP よりもダロルタミド輸送に対する寄与が大きいことが明らかとなった。加えて、BCRP-MDCK 細胞における排出比は 52（10μM）～>80.6（1μM）であった。この排出比は BCRP 典型阻害薬である Ko143 の添加により 6.6（10μM）～8.2（1μM）に低下した。

以上より、ダロルタミドは P-gp 及び BCRP 両方の基質であった。

表 2.6.4.8- 3 P-gp 及び BCRP における基質特性検討試験の概要

Study type	*In vitro* assay, P-gp and BCRP substrate characteristics
Bayer reference	4.2.2.7.4 R-9662, 2.6.5.16 Table 16-4 4.2.2.7.6 R-11872, 2.6.5.16 Table 16-8
Test system	Caco-2 cells and CPT-P1 cells: P-gp; Caco-2 cells and CPT-B1 cells: BCRP; BCRP-MDCK cells: BCRP
Probe Substrates	Digoxin (P-gp); Cladribine (BCRP)
Reference Inhibitors	Cyclosporin A (P-gp); Ko143 (BCRP)
Test compound	Darolutamide: 0.5, 2, 10 µM (Caco-2 cells), 1 and 10 µM (MDCK-BCRP)

2.6.4.8.3 ダロルタミドの取り込みトランスポーターに対する基質特性

参照項目： 4.2.2.7.7 R-9730
4.2.2.7.9 R-12199

ダロルタミドの OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 に対する基質特性を検討した試験概要を表 2.6.4.8- 4 に示す。

各トランスポーターのトランスフェクション細胞及びベクター対照細胞を用い、ダロルタミドの細胞への取り込みを典型阻害薬の存在下又は非存在下で検討した。その結果、ダロルタミドの OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 による能動的な取り込みは認められず、ダロルタミドは OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質ではないことが明らかとなった。

表 2.6.4.8- 4 取り込みトランスポーターに対する基質特性検討試験の概要

Study type	*In vitro* assay, substrate characteristics for uptake transporters
Bayer reference	4.2.2.7.7 R-9730, 2.6.5.16 Table 16-10 4.2.2.7.9 R-12199, 2.6.5.16 Table 16-24
Test system	Vector control- and transfected HEK cells: OATP1B1, OATP1B3, OCT1
Probe substrate	Atorvastatin (OATP1B1, OATP1B3), [^{3}H]MPP^{+} (OCT1)
Standard inhibitor	Rifamycin (OATP1B1, OATP1B3), Decynium 22 (OCT1)
Test compound	Darolutamide: 0.5 - 10 µM (OATP1B1, OATP1B3) [^{14}C]darolutamide: 1 – 10 µM (OCT1)

2.6.4.8.4 ダロルタミドの排出トランスポーターに対する阻害作用

参照項目： 4.2.2.7.4 R-9662
4.2.2.7.11 R-12009
4.2.2.7.12 R-11871
4.2.2.7.17 R-11920
4.2.2.7.14 R-11099

ダロルタミドの排出トランスポーターに対する阻害試験の概要を表 2.6.4.8- 5 に、試験成績を表 2.6.4.8- 6 に示す。

ダロルタミドの P-gp、BCRP、BSEP、MRP2、MATE1 及び MATE2K を介した典型基質の輸送に対する阻害作用を、Caco-2 細胞、各トランスポーターの過剰発現細胞及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いて検討した。その結果、ダロルタミドは P-gp、BCRP、MATE1 及び MATE2K を介した典型基質の輸送に対して阻害作用を示し、ダロルタミドの BCRP 及び P-gp に対する阻害作用の IC_{50} 値はそれぞれ 1.3µM 及び 16.4µM、更に、MATE1 及び MATE2K に対する IC_{50} 値はそれぞれ 32.3

μM 及び 9.5μM であった。一方、ダロルタミドは最高濃度 60μM（BSEP）及び 50μM（MRP2）までの濃度で MRP2 及び BSEP に対する阻害作用を示さなかった。各種トランスポーターに対する阻害作用を介した臨床薬物相互作用の可能性については 2.6.4.9 に記載する。

表 2.6.4.8- 5　排出トランスポーターに対する阻害試験の概要

Study type	*In vitro* assay, inhibitory potential towards P-gp, BCRP, MRP2, BSEP, MATE1 and MATE2K
Bayer reference	4.2.2.7.4 R-9662, 2.6.5.16 Table 16-5 4.2.2.7.11 R-12009, 2.6.5.16 Table 16-17 4.2.2.7.12 R-11871, 2.6.5.16 Table 16-18 4.2.2.7.17 R-11920, 2.6.5.16 Table 16-22 4.2.2.7.14 R-11099, 2.6.5.16 Table 16-19
Test system	Caco-2 cells: P-gp, BCRP transfected HEK cells: MRP2, MATE1, MATE2K sandwich cultured human hepatocytes: BSEP
Probe substrates	Digoxin (P-gp), Cladribin (BCRP), Metformin (MATE1, MATE2K), CDCF (MRP2), Taurocholic acid (BSEP)
Test compound	Darolutamide: 0.25 - 60 µM (P-gp, BCRP), 0.206 – 50 µM (MATE1, MATE2K), 5, 50 µM (MRP2), 0.1 – 60 µM (BSEP)

表 2.6.4.8- 6　排出トランスポーターに対するダロルタミドの阻害作用

Transporter	**Probe substrate**	**IC_{50} [µM]**
P-gp	Digoxin	16.4
BCRP	Cladribine	1.33
BSEP	Taurocholic acid	>60
MRP2	CDCF	>50
MATE1	Metformin	32.3
MATE2K	Metformin	9.5

2.6.4.8.5　ダロルタミドの取り込みトランスポーターに対する阻害作用

参照項目：
4.2.2.7.7　R-9730
4.2.2.7.13　R-11868
4.2.2.7.10　R-11870
4.2.2.7.15　R-11918
4.2.2.7.16　R-11919
4.2.2.7.18　R-11921

ダロルタミドの取り込みトランスポーターに対する阻害作用を、各トランスポーターのトランスフェクション細胞及び典型基質を用いて検討した（表 2.6.4.8- 7）。

ダロルタミドは OATP1B1、OATP1B3 及び OAT3 の典型基質の取り込みに対して阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 16.8μM、39.3μM 及び 4.5μM であった（表 2.6.4.8- 8）。一方、ダロルタミドは OAT1、OCT1、OCT2、OATP2B1 及び NTCP に対して、最高 50μM までの濃度範囲で 50%を超える阻害作用を示さなかった。

各種トランスポーターに対する阻害作用を介した臨床薬物相互作用の可能性については 2.6.4.9 に記載した。

表 2.6.4.8- 7 取り込みトランスポーター阻害試験の概要

Study type	*In vitro* assay, inhibitory potential towards uptake transporters
Bayer reference	4.2.2.7.7 R-9730, 2.6.5.16 Table 16-11 4.2.2.7.13 R-11868, 2.6.5.16 Table 16-14 4.2.2.7.10 R-11870, 2.6.5.16 Table 16-16 4.2.2.7.15 R-11918, 2.6.5.16 Table 16-20 4.2.2.7.16 R-11919, 2.6.5.16 Table 16-21 4.2.2.7.18 R-11921, 2.6.5.16 Table 16-23
Test system	Transfected HEK cells: OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2 OATP2B1, NTCP
Test compound	Darolutamide: 0.25 - 60 µM (OATPs, OAT3), 5 and 50 µM (OCT1, OATP2B1, NTCP, OAT1, OCT2)

表 2.6.4.8- 8 ダロルタミドの取り込みトランスポーターに対する阻害作用

Transporter	**Probe substrate**	**IC_{50} [µM]**
OATP1B1	Atorvastatin	16.8
OATP1B3	Atorvastatin	39.3
OAT1	PAH	>50
OAT3	Furosemide	4.5
OCT1	MPP^+	>50
OCT2	MPP^+	>50
OATP2B1	Estrone 3-sulfate	>50
NTCP	Estrone 3-sulfate	>50

2.6.4.8.6 代謝物 M-1 に関する検討

2.6.4.8.6.1 M-1 の第 I 相代謝酵素に対する基質特性

参照項目： 4.2.2.4.5 PH-40290
4.2.2.4.7 R-9722

M-1 の第 I 相代謝に関与する酵素を同定する *in vitro* 試験概要を表 2.6.4.8- 9 に示す。

SR 体及び SS 体の代謝には酸化と還元が複雑に関連しており、主要な血漿中代謝物 M-1 の薬物動態学的特性をダロルタミドから分離して検討することは困難である。したがって全般的な特性評価は 2.6.4.5.1.1.3 にて議論した。

表 2.6.4.8- 9 M-1 の代謝酵素同定試験の概要

Study type	*In vitro* assay, Phase I metabolizing enzymes involved
Bayer reference	4.2.2.4.5 PH-40290, 2.6.5.10 Table 10-17, Table 10-18 4.2.2.4.7 R-9722, 2.6.5.10 Table 10-11, Table 10-14
Test system	Human hepatocytes (single donors), Human liver cytosol, Human liver microsomes (pool), Recombinant metabolizing enzymes (CYP isoforms, ADH, AKRs, CBR, HSDs)
Test compound	Keto-darolutamide

2.6.4.8.6.2 M-1 の代謝に関わる UGT 分子種の同定

ヒト排泄試験の結果より、グルクロン酸抱合は M-1 の消失に対する明らかな寄与はないことが示された。したがって M-1 の代謝に寄与する UGT 分子種同定に関する検討は実施しなかった。

2.6.4.8.6.3 M-1 の CYP 分子種に対する阻害作用

参照項目： 4.2.2.4.9 R-9948
4.2.2.4.11 PH-39983

ヒト血漿中主要代謝物 M-1 の CYP 阻害作用試験の概要を表 2.6.4.8- 10 に、結果を表 2.6.4.8- 11 に示す。

M-1 は、CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C19、2D6、2E1 及び 3A4 による標準的な基質の代謝に影響を及ぼさないか、又はわずかな阻害作用を示すのみであった。M-1 の最も低い IC_{50} 値は CYP2C9（9.6μM）に対して認められた。

結論として、臨床試験における治療量での薬物動態データ、並びに米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬品庁（EMA）から示されている静的薬物速度論モデルに基づく評価より、ダロルタミド 600mg 投与時、主要な CYP 分子種に対する阻害作用を介して臨床的に問題となる薬物動態学的相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた（2.6.4.5.1.2）。

表 2.6.4.8- 10 M-1 の CYP 分子種に対する阻害作用試験の概要

Study type	*In vitro* assay, CYP inhibition
Bayer reference	4.2.2.4.9 R-9948, 2.6.5.12 Table 12-2 4.2.2.4.11 PH-39983, 2.6.5.12 Table 12-4
Test system	Human liver microsomes (pool)
Test compound	Keto-darolutamide

表 2.6.4.8- 11 M-1 の CYP 阻害作用

CYP isoform	Substrate	Enzyme source	IC_{50} [μM]
1A2	Phenacetin	Human liver microsomes	> 100
2A6	Coumarin	Human liver microsomes	n.i.
2B6	Bupropion	Human liver microsomes	54.2
2C8	Paclitaxel	Human liver microsomes	48.6
2C9	Diclofenac	Human liver microsomes	9.6
2C19	*S*-Mephenytoin	Human liver microsomes	39.5
2D6	Bufuralol	Human liver microsomes	51.9
2E1	Chlorzoxazone	Human liver microsomes	n.i.
3A4	Midazolam	Human liver microsomes	> 50
	Midazolam	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 50
3A4	Testosterone	Human liver microsomes	> 50
	Testosterone	Human liver microsomes (with pre-incubation)	> 50

n.i.= no inhibition within the concentration range tested

2.6.4.8.6.4 M-1 の UGT 分子種に対する阻害作用

参照項目： 4.2.2.4.13 R-11222

M-1 の UGT 阻害作用を検討した試験の概要を表 2.6.4.8- 12 に、試験成績を表 2.6.4.8- 13 に示す。

主要なヒトグルクロン酸転移酵素 UGT1A1、1A4、1A6、1A9 及び 2B7 に対する M-1 の阻害作用を検討したところ、M-1 については UGT1A1 に対する阻害作用が認められ、IC_{50} 値は 6.41μM、K_i 値は 8.13μM であった。一方、UGT1A4、1A6、1A9 及び 2B7 の活性には明らかな影響を及ぼさなかった（IC_{50} 値＞50μM）。

結論として、治療量における血漿中非結合型薬物濃度が低い（M-1 は 0.04μM 未満）ことから、UGT 分子種によって主に代謝される薬物と併用しても、臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた（表 2.6.4.8- 13）。

表 2.6.4.8- 12　M-1 の UGT 阻害試験の概要

Study type	*In vitro* assay, UGT inhibition
Bayer reference	4.2.2.4.13 R-11222, 2.6.5.12 Table 12-7
Test system	Human liver microsomes
Test compound	Keto-darolutamide

表 2.6.4.8- 13　ヒト肝ミクロソーム（プール）における M-1 の UGT 阻害作用（IC_{50} 値：n=2 の平均値、K_i 値：n=3 の平均値）

UGT Isoform	Substrate / Product	Keto-darolutamide IC_{50} [μM]	Keto-darolutamide K_i [μM]
1A1	Estradiol / Estradiol 3-glucuronide	6.41	8.13[a]
1A4	Trifluoperazine / Trifluoperazine *N*-glucuronide	>50	n.d.
1A6	Serotonin / Serotonin glucuronide	>50	n.d.
1A9	Propofol / Propofol-*O*-glucuronide	>50	n.d.
2B7	AZT / AZT 5'- glucuronide	>50	n.d.

a = competitive inhibition
AZT = 3'-azido-3'-deoxythyimidine
n.d.=not determined

2.6.4.8.6.5　M-1 の DPD に対する阻害作用

参照項目： 4.2.2.4.14　PH-40239

M-1 の DPD 阻害試験の概要を表 2.6.4.8- 14 に示す。

DPD による 5-フルオロウラシルからの代謝物 5-フルオロジヒドロウラシル産生について、M-1 存在下及び非存在下で検討した結果、M-1 は *in vitro* での 5-フルオロウラシルの代謝に対して影響を及ぼさず、最高濃度の 50μM でも IC_{50} 値に到達しなかった。陽性対照の 5-ブロモウラシルは、5-フルオロウラシル代謝を明らかに阻害した。

結論として、これらの *in vitro* データによると、M-1 が臨床で DPD による 5-フルオロウラシルの代謝を阻害する可能性は低いと考えられた。

表 2.6.4.8- 14 M-1 の DPD 阻害作用

Study type	*In vitro* assay, DPD inhibition
Bayer reference	4.2.2.4.14 PH-40239, 2.6.5.12 Table 12-8
Test system	Human liver cytosol (pool)
Test compound	Keto-darolutamide

2.6.4.8.6.6 M-1 の CYP 分子種に対する誘導作用

参照項目： 4.2.2.4.15 PH-40105

M-1 の CYP 誘導作用に関する試験の概要を表 2.6.4.8- 15 に、試験成績を表 2.6.4.8- 16 に示す。使用したヒト初代培養肝細胞は、3 名のドナーから別々に調製した。

いずれのドナー由来の肝細胞においても、M-1 は最高濃度 10mg/L まで CYP1A2 及び CYP2B6 の mRNA レベル及び酵素活性レベルに対し顕著な誘導作用を示さなかった（E_{max} は 2 倍未満）。

一方で M-1 はすべてのドナー由来の肝細胞において、CYP3A4 の mRNA レベルを濃度依存的に誘導した。最も感受性の高いドナーでは mRNA レベルは 9.6 倍に誘導された（リファンピシンの 23%）。CYP3A4 酵素活性レベルに対しても濃度依存的な誘導が認められた。

臨床において、M-1 の CYP3A4 誘導作用によって薬物相互作用が引き起こされる可能性について RIS を指標に検討した。ヒト肝細胞における *in vitro* 誘導試験の結果、及び反復投与後の臨床曝露量（ダロルタミド 600mg を 1 日 2 回経口投与、2.7.2.2.4.2.1）を評価に用いた。

このモデルに基づくと、M-1 は CYP3A4 の指標基質ミダゾラムに対して誘導作用により軽度から中程度の影響を及ぼし、AUC は最大 58%減少すると推測された。

In vitro において肝細胞と共にインキュベートした場合、出発物質に関わらずダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 は、極めて速やかに平衡状態となった（4.2.2.4.5 PH-40290）。したがって *in vitro* にて認められた誘導作用が、ダロルタミド（SR 体又は SS 体）や主要代謝物 M-1 のうちのいずれに起因しているかを特定することはできない。ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 による誘導作用が非常に類似したのは、おそらくインキュベーション中に、添加した化合物以外も産生されたことによると考えられた。

ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の総合的な RIS 評価に基づき、ダロルタミド投与時にミダゾラムの血漿中曝露量を軽度から高度の範囲で減少させる可能性が考えられた。

表 2.6.4.8- 15 M-1 の CYP 誘導試験の概要

Study type	*In vitro* assay, induction of CYP1A2, CYP3A4, and CYP2B6
Bayer reference	4.2.2.4.15 PH-40105, 2.6.5.12 Table 12-9
Test system	Cultured human hepatocytes (3 donors)
Test compound	Keto-darolutamide (5-10000 µg/L)

表 2.6.4.8- 16 M-1 の CYP 誘導作用

CYP	**Result for keto-darolutamide**
1A2 (mRNA/activity)	No induction up to 10000 µg/L
2B6 (mRNA/activity)	No induction up to 10000 µg/L
3A4 (mRNA/activity)	Conc.-dependent induction up to 9.6-fold

2.6.4.8.6.7　M-1 の排出トランスポーターに対する基質特性

参照項目：　4.2.2.7.6　R-11872
4.2.2.7.5　R-11874

M-1 の P-gp 及び BCRP に対する基質特性を検討した試験の概要を表 2.6.4.8- 17 に示す。

P-gp 及び BCRP をトランスフェクトした MDCK-MDR1 及び MDCK-BCRP 細胞における M-1 の排出比は、濃度 1μM 及び 10μM において MDCK-MDR1 でそれぞれ 69.3 及び 25.3、MDCK-BCRP で濃度 1μM での 13.5 から 10μM での 1.72 の範囲であった。

これらのデータにより M-1 は P-gp 及び BCRP の基質に分類された。M-1 の能動輸送の飽和は両トランスポーター共に試験濃度 10μM までに観察されたが、BCRP の方が P-gp よりも顕著であった。

表 2.6.4.8- 17　P-gp 及び BCRP に対する基質特性検討試験の概要

Study type	*In vitro* assay, P-gp and BCRP substrate characteristics
Bayer reference	4.2.2.7.6 R-11872, 2.6.5.16 Table 16-8 4.2.2.7.5 R-11874, 2.6.5.16 Table 16-6
Test system	MDCK-MDR1 cells: P-gp MDCK-BCRP cells: BCRP
Probe Substrates	Digoxin (P-gp); Cladribine (BCRP)
Standard Inhibitors	Valspodar (P-gp); Ko143 (BCRP)
Test compound	Keto-darolutamide: 1 - 10 µM

2.6.4.8.6.8　M-1 の取り込みトランスポーターに対する基質特性

参照項目：　4.2.2.7.8　R-11866
4.2.2.7.9　R-12199

M-1 の OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 に対する基質特性検討試験の概要を表 2.6.4.8- 18 に示す。

ベクター又はトランスポーターをトランスフェクトした細胞を用いて M-1 の取り込みを典型阻害薬存在下又は非存在下で検討したところ、M-1 の OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 による能動的な取り込みは認められなかった。したがって M-1 は OATP1B1、OATP1B3 又は OCT1 の基質ではないことが明らかとなった。

表 2.6.4.8- 18　M-1 の取り込みトランスポーターにおける基質特性検討試験の概要

Study type	*In vitro* assay, substrate characteristics for uptake transporters
Bayer reference	4.2.2.7.8 R-11866, 2.6.5.16 Table 16-12 4.2.2.7.9 R-12199, 2.6.5.16 Table 16-24
Test system	Vector- or transporter-transfected HEK cells: OATP1B1, OATP1B3, OCT1
Probe substrate	Atorvastatin (OATP1B1, OATP1B3), MPP^+ (OCT1)
Standard inhibitor	Rifamycin (OATP1B1, OATP1B3), Decynium 22 (OCT1)
Test compound	Keto-darolutamide: 1 and 10 µM (OATP1B1, OATP1B3) [^{14}C]keto-darolutamide: 1 and 10µM (OCT1)

2.6.4.8.6.9　M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用

参照項目：
4.2.2.7.6　R-11872
4.2.2.7.5　R-11874
4.2.2.7.11　R-12009
4.2.2.7.12　R-11871
4.2.2.7.14　R-11099
4.2.2.7.17　R-11920

M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用を検討する試験の概要を表 2.6.4.8- 19 に、試験成績を表 2.6.4.8- 20 に示す。

M-1 の P-gp、BCRP、BSEP、MRP2、MATE1 及び MATE2K に対する阻害作用を、各トランスポーターの過剰発現細胞及びサンドイッチ培養ヒト肝細胞にて検討した。その結果、M-1 は P-gp、BCRP、MATE1 及び MATE2K による典型基質の輸送に対して阻害作用を示し、BCRP 及び P-gp に対する阻害作用の IC_{50} 値はそれぞれ 0.6μM 及び 2.6μM であった。更に、M-1 は MATE2K に対する阻害剤であり、IC_{50} 値は 3.0μM であった。M-1 の MATE1 に対する IC_{50} 値は＞10μM であった。

一方、M-1 は MRP2 に対しては最高濃度 10μM（溶媒における溶解度の限界）まで、BSEP に対しては最高濃度 300μM（高濃度では培地を 4%BSA とした）までの濃度範囲において、阻害作用を示さなかった。

M-1 の各種トランスポーターに対する阻害作用を介した臨床薬物相互作用の可能性についてはダロルタミドと合わせて 2.6.4.9 に記載した。

表 2.6.4.8- 19　M-1 の排出トランスポーターに対する阻害試験の概要

Study type	*In vitro* assay, inhibitory potential towards P-gp, BCRP, MRP2, BSEP, MATE1, and MATE2K
Bayer reference	4.2.2.7.6 R-11872, 2.6.5.16 Table 16-9 4.2.2.7.5 R-11874, 2.6.5.16 Table 16-7 4.2.2.7.11 R-12009, 2.6.5.16 Table 16-17 4.2.2.7.12 R-11871, 2.6.5.16 Table 16-18 4.2.2.7.14 R-11099, 2.6.5.16 Table 16-19 4.2.2.7.17 R-11920, 2.6.5.16 Table 16-22
Test system	MDCK-MDR1 cells: P-gp, MDCK-BCRP cells: BCRP transfected HEK cells: MATE1 and MATE2K transfected HEK cells: MRP2 sandwich cultured human hepatocytes BSEP
Probe Substrates	Digoxin (P-gp), Cladribine (BCRP), Metformin (MATE1, MATE2K), CDCF (MRP2), Taurocholic acid (BSEP)
Test compound	Keto-darolutamide: 0.0412 µM to 10 µM (P-gp), 0.0412 µM to 10 µM (BCRP), 1 µM and 10 µM (MATE1, MRP2), 1 µM to 300 µM (BSEP), 0.313 µM to 10 µM (MATE2K)

表 2.6.4.8- 20 M-1 の排出トランスポーターに対する阻害作用

Transporter	Probe substrate	IC_{50} [μM]
P-gp	Digoxin	2.6
BCRP	Cladribine	0.6
MRP2	CDCF	>10
BSEP	Taurocholic acid	>300
MATE1	Metformin	>10
MATE2K	Metformin	2.9

2.6.4.8.6.10 M-1 の取り込みトランスポーターに対する阻害作用

参照項目： 4.2.2.7.13 R-11866
4.2.2.7.10 R-11870
4.2.2.7.8 R-11866
4.2.2.7.15 R-11918
4.2.2.7.16 R-11919
4.2.2.7.18 R-11921

M-1 の取り込みトランスポーターに対する阻害試験の概要を表 2.6.4.8- 21 に、試験成績を表 2.6.4.8- 22 に示す。

トランスポーターをトランスフェクトした細胞にて典型基質の輸送に対する M-1 の阻害作用を検討したところ、M-1 は OAT 及び OCT2 に対して最高濃度 2μM まで、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1 及び NTCP に対して最高濃度 10μM まで有意な阻害作用を示さなかった。

表 2.6.4.8- 21 M-1 の取り込みトランスポーターに対する阻害作用

Study type	*In vitro* assay, inhibitory potential towards uptake transporters
Bayer reference	4.2.2.7.13 R-11868, 2.6.5.16 Table .16-15 4.2.2.7.10 R-11870, 2.6.5.16 Table .16-16 4.2.2.7.8 R-11866, 2.6.5.16 Table .16-13 4.2.2.7.15 R-11918, 2.6.5.16 Table .16-20 4.2.2.7.16 R-11919, 2.6.5.16 Table .16-21 4.2.2.7.18 R-11921, 2.6.5.16 Table .16-23
Test system	Transfected HEK cells: OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3; OCT1, OCT2, OATP2B1, NTCP
Test compound	Keto-darolutamide: 0.2 and 2 μM (OATs, OCT2); 1 and 10 μM (OATPs, OCT1, NTCP)

表 2.6.4.8- 22 M-1 の取り込みトランスポーターに対する阻害作用

Transporter	Probe substrate	IC_{50} [μM]
OATP1B1	Atorvastatin	>10
OATP1B3	Atorvastatin	>10
OAT1	PAH	>2
OAT3	Furosemide	>2
OCT1	MPP^+	>10
OCT2	MPP^+	>2
OATP2B1	Esterone 3-sulfate	>10
NTCP	Esterone 3-sulfate	>10

2.6.4.9　考察及び結論

ダロルタミドは 2 種のジアステレオマーSR 体及び SS 体の等量混合物であることから、大半の試験では SR 体と SS 体を分別定量した。しかしながら、*in vitro* 及び *in vivo* における評価の上では、生体試料中の SR 体と SS 体の和も便宜上ダロルタミドと称した。食餌によって、ダロルタミドの消化管吸収は増加することがイヌにおいて示されたため、反復投与による薬物動態試験及び毒性試験ではダロルタミドの投与は非絶食下で行った。濃度依存的な血漿タンパク結合の飽和がイヌ特異的に認められ、非線形の薬物動態を示したことから、イヌにおいてはみかけの薬物動態パラメータを示した。

ダロルタミドは Wistar 系ラット、ビーグル犬及びヒトに静脈内投与後、同様の薬物動態を示し、血漿クリアランスは低く、分布容積は大きかった。静脈内投与後の終末相における消失半減期は長く、ラット、イヌ及びヒトでそれぞれ約 4、7 及び 12 時間（2.7.1.2.2）であった。一方で、ダロルタミド投与後の SR 体と SS 体の血漿中濃度には種差が認められた。反復経口投与後の AUC としてラットの血漿中で SR 体と SS 体の比はほぼ 1：1 であったが、マウス及びイヌでは SR 体が多く存在し、SR 体の血漿からの消失が SS 体よりも遅いことが示唆された。静脈内投与後のイヌにおいては SR 体のみかけの CL が 0.11L/(kg･h)、SS 体のみかけの CL が 0.70L/(kg･h)であった。ヒトでは SS 体が多く存在し、ダロルタミド静脈内投与後における SS 体の血漿クリアランス 4.63L/h は SR 体の血漿クリアランス 13.3L/h の約 3 分の 1 であった（2.7.1.2.2）。更に、ヒト及び動物の初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 試験及びイヌに SR 体又は SS 体を投与したときの *in vivo* 試験結果より、SR 体と SS 体は M-1 を介して相互変換することが明らかとなった。

ダロルタミドは非絶食下で経口投与したとき、げっ歯類及びイヌにおいて比較的速やかに吸収された。1 日 1 回反復経口投与後に蓄積は認められなかったが、これはラット及びイヌに経口投与後の血漿中ダロルタミド濃度の終末相における消失半減期が平均値でラットは 3～5 時間、イヌではみかけ上 7～17 時間であったことと矛盾はなかった。4 週間の反復経口投与毒性試験においてダロルタミドの全身曝露量は、低用量から中用量の間では用量比を下回る増加を認めたが、中用量から高用量の間での増加はわずかであり、溶解性が低いことに起因すると考えられる吸収の飽和が、ラットでは 300mg/kg、イヌでは 200mg/kg で認められた。

ダロルタミドを反復経口投与したときの定常状態において、血漿中のSR体とSS体のAUC比はラットでほぼ1：1であった。イヌ及びマウス血漿中ではSR体が多く存在し、SR体とSS体のAUC比はそれぞれ約9：1及び約8：2であったが、ヒト（2.7.2.2.2.1）では逆に約1：6とSS体が多かった。

ダロルタミドの絶対的バイオアベイラビリティは溶液投与のラットでは高く（ほぼ 100%）、静脈内投与時と経口投与時の尿中排泄率の比較から吸収は完全であった。イヌでは絶対的バイオアベイラビリティは低く、絶食下投与で 12.6%、非絶食下では 16.3%であった。非絶食下でバイオアベイラビリティがやや高かったのは、食餌によって懸濁液からのダロルタミド溶出が消化管内で増加したためと考えられる。ヒトでは食事の影響は更に大きく、600mg の錠剤投与時の曝露量は絶食下投与の約 2～2.5 倍に増加した（2.7.1.3.4）。

ダロルタミドの第 2 級アルコールのケトン体への酸化によって産生される M-1（ケト-ダロルタミド）は、マウス、ラット、イヌ及びヒトの血漿中にみられる唯一の主要な代謝物であった。この代謝物はダロルタミド（すなわち、SR 体及び SS 体）と同様の薬理活性を有する。血漿中 M-1 の AUC は、ラット及びヒトにおいて総放射能 AUC のそれぞれ約 28%及び約 59%を占めた。したがって M-1 は ICH M3(R2)[5]に従いヒトにおける主要代謝物と定義され、非臨床薬物動態、薬理、毒性試験に加え、臨床試験でも測定した。すべての動物種において SR 体と SS 体は M-1 を介して

相互変換が認められたが、ヒトでは SS 体への変換がかなり優勢であった。ヒト血漿中において、動物で曝露の確保されていない不均衡性代謝物は認められなかった。

血漿中 M-1 濃度の定常状態（最長 28 日間の反復経口投与）における AUC(0-24)は、親化合物の AUC(0-24)に対して、ラットで 1.2～1.4 倍、イヌでは 0.7 倍であった。ヒトに反復経口投与後、M-1 の AUC は最大で親化合物の約 2 倍であった（2.7.1.2.2）。

ダロルタミドの血漿タンパク結合率は、イヌを除く動物及びヒトでは濃度によらず中等度であり、非結合型分率はげっ歯類での約 5%からヒトでの 8%までの範囲であった。血漿タンパク結合には種差が認められ、イヌでは濃度の上昇に伴い非結合型分率は 0.7%から 8.4%に上昇した。M-1 の血漿タンパク結合率はダロルタミドよりも明らかに高く、非結合型分率はヒトでは 0.2%、げっ歯類では約 1%、イヌでは 3.4%（結合の飽和が推測される高濃度での値）であった。げっ歯類及びヒトでは、約 10000ng/mL までの薬理及び毒性試験の濃度範囲内においてダロルタミド及び M-1 の血漿タンパク結合の飽和は認められなかった。タンパク結合の飽和はイヌで特異的に認められたが、毒性試験での高濃度におけるタンパク結合率はイヌを含めてすべての動物において同程度であり、ヒトとの全身曝露の比較において問題にならないと考えられた。

血液中で、ダロルタミドは動物種及び濃度によらず主に血漿に存在した。C_{blood}/C_{plasma} はイヌでの 0.49 からヒトでの 0.77 の範囲であった。M-1 についてはその範囲は狭く、イヌでの 0.50 からマウスでの 0.54 の範囲（ヒト：0.51）であった。しかしながら、イヌでは非結合型分率の濃度依存性は C_{blood}/C_{plasma} にも影響し、M-1 濃度の上昇に伴い C_{blood}/C_{plasma} は 0.5 から 0.7 に増加した。

ラットに[^{14}C]ダロルタミドを経口投与したとき、血液中の放射能は脳を除くほとんどの臓器・組織に広範かつ均一に分布した。大半の臓器・組織の曝露量 AUC(0-24)は血液と同程度か、むしろ低かった。臓器・組織中濃度の血漿中濃度に対する比は排泄器官である肝臓及び腎臓で最も高かったが、それでも AUC(0-24)は血液よりわずかに大きい程度であった。総放射能濃度に基づく脳 AUC の血漿 AUC に対する比は 0.045 であり、血液脳関門の透過性が非常に低いことが明らかとなった。一方、標的組織である前立腺 AUC の血漿 AUC に対する比は脳よりも約 10 倍高い 0.43 であった。有色ラットの皮膚有色部を含むメラニン含有組織に対する放射能の可逆的な結合がわずかに認められたが、ラットすべての臓器・組織を通して放射能の不可逆的な結合又は残留を示す所見は認められなかった。ラット体内に残存する放射能は、投与後 7 日及び 28 日時点において投与量のそれぞれ 1%未満及び 0.2%に過ぎなかった。マウスにおけるダロルタミド及び M-1 の主要な臓器・組織中濃度を測定した臓器・分布試験の結果は、ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィと同じであった。マウス及びラットにおいて、ダロルタミド及び M-1 の脳移行性は無視できる程度のものであった（脳 AUC／血漿 AUC＜0.05）。

ラット及びヒトにおいて、親化合物と代謝物との排泄量のバランスは均衡しており、ラットでそれぞれ約 45%及び 55%、ヒトでそれぞれ約 40%及び 60%であった。排泄物中に認められた代謝物は、中心のアルキル部分の酸化的開裂及び／又は、側鎖の水酸基の酸化又は *O*-及び *N*-グルクロン酸抱合により産生された。ダロルタミドの酸化的代謝、特に薬理活性を有する血漿中の主要な代謝物 M-1 の産生は、主に CYP3A4 により触媒された。ダロルタミドのグルクロン酸抱合は複数の UGT 分子種により触媒され、主に UGT1A9、次いで 1A1、1A3 及び 2B10 の寄与が認められた。また SR 体及び SS 体は M-1 を介して相互変換された。ヒトでは、M-1 のダロルタミドへの還元は主に AKR1C3 により触媒されたが、SS 体の産生が優勢であった。親化合物のダロルタミドは主に胆汁及び消化管分泌により糞便中に排泄され、尿中にも排泄された。ダロルタミドは *in vitro* にて P-gp 及び BCRP の基質であったことから、これらのトランスポーターがダロルタミド(及び M-1)の排泄に寄与している可能性がある。ダロルタミド及び M-1 の $C_{max,u}$ はそれぞれ 0.67 μM 及び 0.04 μM であることを考慮すると、臨床血漿中濃度では能動輸送の飽和は起こっていな

いと考えられた。互いに独立しており、かつほぼ均等な 3 種類の消失経路（親化合物としての尿糞中排泄、酸化的代謝、グルクロン酸抱合）が存在することにより、ヒトにおいてダロルタミドが被相互作用薬となる可能性は軽減されると考えられた。

代謝酵素同定に関する *in vitro* での検討及びヒトでのマスバランス試験の結果は、ダロルタミドの消失全体に対する CYP3A4 の寄与を検討した臨床薬物相互作用試験成績によって裏付けられた。すなわち、強い CYP3A4、P-gp 及び BCRP の阻害薬であるイトラコナゾール[6]の併用によるダロルタミドの AUC の増加は 1.75 倍、C_{max} の増加は 1.36 倍とわずかであった（2.7.2.2.4.2.2）。結果として、ダロルタミドの曝露量に対する CYP3A4 阻害の影響は小さいことが確認された。この影響の程度については、消失に対する CYP3A4 の寄与（f_{CL}）が 30%、CYP3A4 の阻害により予測される AUC 増加は 1.43 倍〔AUCR=1/(1-f_{CL})〕であることと矛盾はなかった。この試験では M-1 の曝露量もわずかに増加した〔AUC(0-t_{last}) 1.80 倍〕。強い CYP3A4 及び P-gp の誘導薬であるリファンピシンの併用により、ダロルタミドの AUC は 28%、C_{max} は 48%に減少したことから、ダロルタミドは CYP3A4 誘導に対する中等度の感受性を有すると考えられた。M-1 の AUC も 25%まで減少した（2.7.2.2.4.2.2）。

酵素阻害試験において、主要な CYP 分子種、UGT 分子種及び DPD の酵素活性はダロルタミド、SR 体、SS 体又は M-1 により顕著な影響を受けなかった。最も低い IC_{50} 値は M-1 の CYP2C9（9.6 μM）及び UGT1A1（6.4 μM）に対する阻害で認められた。CYP2C9 阻害に関して静的薬物速度論モデルにより検討したところ、ダロルタミド投与により臨床的に問題となる薬物動態学的相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。酵素誘導試験において、ダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 は、最高濃度 10000 μg/L まで CYP1A2 及び CYP2B6 を誘導しなかった。一方、CYP3A4 に対しては濃度依存的に mRNA 及び酵素活性を最大 13 倍に誘導したが、臨床薬物相互作用試験において、ダロルタミドを CYP3A4 感受性基質ミダゾラムと併用したとき、ミダゾラムの曝露量の減少は軽度（29%減少）にとどまった。このとき、1-ヒドロキシミダゾラムの曝露量も軽度減少した（22%減少）。これらの結果は、ダロルタミドは CYP3A4 の誘導を介して軽度の相互作用を引き起こす可能性を示した（2.7.2.2.4.2.3）。ダロルタミドは、5 μM の低濃度では膜透過性の低い化合物に分類された。しかしながら、透過性パラメータはほぼ高透過性化合物に近似していた。高濃度では膜透過性は増加し、透過性の高い化合物に分類された。この濃度依存的な透過性の増加は、ダロルタミド及び M-1 を基質とする P-gp 及び BCRP の飽和によって生じたと考えられた。SR 体及び SS 体の透過係数及び排出比には大きな差は認められず、P-gp 及び BCRP に対する基質特性はジアステレオマー間で同様と考えられた。

ダロルタミドの臨床投与量に基づく高い消化管内濃度〔最高 270 μM（食餌人工腸液における溶解限度、2.3.P.5.3.4）〕を考慮すると、*in vivo* では消化管の排出トランスポーターの飽和が予測された。したがって、P-gp 及び BCRP 阻害薬を併用してもダロルタミドの吸収に顕著な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。これは溶液としてヒトに経口投与したとき、絶対的バイオアベイラビリティが約 100%であったこと（2.7.1.1.4）、P-gp、BCRP 及び CYP3A4 阻害薬であるイトラコナゾールを併用したときのダロルタミドの全身曝露量に対して影響が小さかったこと（1.75 倍に増加）からも支持された。加えて、CYP3A4 の完全な阻害に起因すると仮定した前述の AUC 増加（1.43 倍）は、イトラコナゾールによる実際の AUC 増加と一致するものであった。したがって、ダロルタミドの AUC 増加に対して、イトラコナゾールによる CYP3A4 の阻害以外に、全身及び消化管における P-gp 及び BCRP 阻害が寄与した可能性は低いと考えられた。

上述の消化管内とは対照的に、ダロルタミド及び M-1 の平均 $C_{max,u}$ を考慮すると、全身の P-gp 及び BCRP の輸送は飽和していないと考えられた。げっ歯類での臓器・組織分布試験において、脳の曝露が低かったのは、これらの排出トランスポーターによってダロルタミド及び M-1 の脳への移行が制限されたものと考えられた。

ダロルタミド及びM-1はOATP1B1、OATP1B3又はOCT1の基質ではなかったことから、能動的に肝細胞に取り込まれることはないと考えられた。

ダロルタミドは複数のトランスポーターに対して阻害作用を示し、阻害の強い順にBCRP、OAT3、MATE2K、P-gp、OATP1B1、MATE1及びOATP1B3に対するIC_{50}値はそれぞれ1.3μM、4.5μM、9.5μM、16.4μM、16.8μM、32.3μM及び39.3μMであった。更に、M-1にも阻害作用が認められ、阻害の強い順にBCRP、P-gp及びMATE2Kに対するIC_{50}値はそれぞれ0.6μM、2.6μM及び2.9μMであった。一方、ダロルタミド及びM-1のいずれもMRP2、BSEP、OAT1、OCT1、OCT2、OATP2B1及びNTCPに対しては阻害作用を示さなかった。M-1については、取り込みトランスポーターであるOAT1、OCT1、OCT2、OATP2B1及びNTCPに対する阻害作用を示さなかったことから、取り込みトランスポーターの阻害を介して薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた。

*In vitro*で最も強い阻害作用の示されたBCRPについて、ダロルタミドは消化管のBCRPを阻害することによって相互作用を引き起こす可能性が予測され、これは臨床薬物相互作用試験によって確認された。BCRPによって影響を受けやすい基質で、OATP1B1/3の基質でもあるロスバスタチンの全身曝露は、ダロルタミド併用によってAUC及びC_{max}がそれぞれ約5倍に増加した（2.7.2.2.4.2.1）。しかしながら、ロスバスタチンの吸収率は50%[7]と報告されており、この報告に基づくと消化管BCRPの阻害による曝露量の増加は理論上最大でも2倍である。この2倍を超える曝露量の増加は、食事の影響と考えられた。臨床薬物相互作用試験ではダロルタミドの最大曝露量を得るために、非絶食下で投与が行われたため、食事の影響によってロスバスタチンの吸収が減少し[8]、BCRP阻害によって生じる全身曝露の上昇の幅が大きくなった可能性が考えられた。更に、全身のBCRP阻害（肝細胞からの胆汁排泄阻害）の寄与、並びにOATP1B1、OATP1B3及びOAT3阻害の寄与も考えられるが、後述するようにBCRP以外のトランスポーター阻害が影響した可能性は低いと考えられた。

OATPに対する阻害作用に関しては、ダロルタミドによってOATP1B1及びOATP1B3が阻害されることにより臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。肝臓の入り口における非結合型ダロルタミド濃度（$[I]_{in,max,u}$）とIC_{50}値を用いた検討で、$[I]_{in,max,u}/IC_{50}$はOATP1B1に対して0.1、OATP1B3に対して0.04であった。M-1については、IC_{50}値として*in vitro*試験で用いた最高濃度10μMを保守的に使用すると、$[I]_{in,max,u}/IC_{50}$はOATP1A1及びOATP1B3いずれについても0.02であった。OATP1B1及びOATP1B3の典型阻害薬として知られるシクロスポリンの$[I]_{in,max,u}/IC_{50}$はそれぞれ55.5及び18.5であり[9]、ダロルタミド及びM-1の$[I]_{in,max,u}/IC_{50}$はシクロスポリンと比べて極めて低かった。

OAT3及びMATEに対する阻害作用に関しては、ダロルタミドによってOAT3及びMATEが阻害されることにより臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。ダロルタミドのOAT3に対する$C_{max,u}/IC_{50}$は0.15、M-1の$C_{max,u}/IC_{50}$は＜0.1であり、OAT3の阻害薬であるプロベネシド（～7.4[10,11,12]）と比べると極めて低く、臨床での薬物相互作用の可能性は低いと考えられた。更に、ロスバスタチンはOAT3基質としても知られており[13]、臨床薬物相互作用試験（5.3.3.4.1 PH-39412）においてロスバスタチンの尿中排泄にダロルタミド併用の影響がみられなかったことからも、OAT3の阻害を介する相互作用の可能性が低いことが支持された。MATE阻害に関しては、ダロルタミドのMATE2Kに対する$C_{max,u}/IC_{50}$は0.07、M-1では0.01であった。MATE1に対する$C_{max,u}/IC_{50}$は両化合物共に0.02であった。これらはMATE阻害薬シメチジンのMATE2Kに対する$C_{max,u}/IC_{50}$の＞3.3、MATE1に対する＞1.2[14]よりも極めて低かった。それゆえ、ダロルタミドのMATEに対する阻害作用により臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。

P-gpに対する阻害作用に関しては、P-gpにより影響を受けやすい基質ダビガトランエテキシラートをダロルタミドと併用した臨床薬物相互作用試験において、ダビガトランの曝露量に対する明確な影響はみられなかった（2.7.2.2.4.2.3）。したがって、ダロルタミドによるP-gp阻害

によって臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられた。ダビガトランの吸収及び曝露量に対して明確な影響がなかったのは、ダロルタミドの P-gp に対する IC_{50} 値が 16.4μM と相対的に高かったことによる可能性が考えられた。薬物相互作用ガイドラインによると、消化管での予測最高濃度（投与量／250mL）が *in vitro* の IC_{50} 値の 10 倍以上の場合、臨床薬物相互作用試験の実施を考慮することが推奨されている。ダロルタミドについては、食餌人工腸液における溶解限度は 270μM であった。これは、IC_{50} 値の 10 倍を 1.6 倍程度に超えていたものの、実際の消化管中でのダロルタミド濃度は P-gp に対して顕著な阻害作用を示す濃度には到達しなかったと考えられた。また、全身の P-gp を阻害した兆候も認められなかった。

2.6.4.10　図表

図表は本文中の適切な位置に配置した。

引用文献一覧

1) EMA, Guideline on Bioanalytical Method Validation.2011

2) FDA, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001

3) EMA, European Medicines Agency CfHMPC. Guideline on the Investigation of Drug Interactions: June 2012

4) FDA, Department of Health and Human Services FaDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry: Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations:Feb.2012

5) ICH, Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2):2009

6) Vermeer LM et al., Drug Metab Dispos. 2016:44:453-459 (4.3.8)

7) Martin PD et al., Clin Ther 2003:25(10):2553-2563 (4.3.23)

8) McLean CC et al., Clin Pharmacol Ther. 2018:104(3):525-533 (4.3.9)

9) Elsby R et al., Clin Pharmacol Ther. 2012 :92(5):584-598 (4.3.25)

10) Emanuelsson BM et al., Eur J Clin Pharmacol 1987:32:395-401 (4.3.11)

11) Maeda K et al., Eur J Pharm Sci 2014:59:94-103 (4.3.12)

12) Stocker SL et al., Clin Pharmacokinet 2008:47(2):111-118 (4.3.13)

13) Windass AS et al., J Pharmacol Exp Ther 2007:322(3):1221-1227 (4.3.24)

14) Elsby R et al., Pharmacol Res Perspect 2017:5(5) (4.3.10)

2.6.5.1 薬物動態試験： 一覧表

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Analytical methods					
Synthesis	n.a. / n.a.	n.a. / n.a.	[^{14}C]darolutamide	R-11019[a]	4.2.2.1.1
Synthesis	n.a. / n.a.	n.a. / n.a.	[^{13}C]darolutamide [^{13}C]keto-darroltamide	R-11020[a]	4.2.2.1.2
Synthesis	n.a. / n.a.	n.a. / n.a.	[^{14}C]darolutamide	PH-39708	4.2.2.1.3
Analytical Methods	n.a. / n.a.	n.a. / LC-MS/MS	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide keto-darolutamide	R-9746[b]	4.2.2.1.4
Analytical Methods	n.a. / n.a.	n.a. / LC-MS/MS	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	R-9912[b]	4.2.2.1.5
Analytical Methods	n.a. / n.a.	n.a. / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-9977[b]	4.2.2.1.6
Analytical Methods	n.a. / n.a.	n.a. / LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	R-11021[b]	4.2.2.1.7
Pharmacokinetics					
Pharmacokinetics	Rat / Wistar	IV / LC-MS/MS	Darolutamide	PH-40003	4.2.2.2.1
Pharmacokinetics	Rat / Wistar	IV + PO/ LSC, LC-MS/MS	[^{14}C]darolutamide	R-9663[b]	4.2.2.5.1
Pharmacokinetics	Dog / Beagle	IV + PO / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9661[a]	4.2.2.2.2
Pharmacokinetics	Dog / Beagle	IV + PO / LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	R-9733[bc]	4.2.2.2.3

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies (continued)

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Pharmacokinetics (continued)					
Pharmacokinetics repeated dose	Mouse / Balb/c nu	PO + SC / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9723[ab]	4.2.2.2.4
Pharmacokinetics repeated dose	Mouse / Balb-c nu	PO / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9919[ab]	4.2.2.2.5
Pharmacokinetics single and repeated dose	Rat / Wistar	PO / LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	R-9881[bc]	4.2.2.2.6
Pharmacokinetics repeated dose	Rat / SD	PO / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9976[ab]	4.2.2.2.7
Distribution					
Plasma protein binding	Mouse / CD-1, Mouse / Balb/c Rat / Wistar Dog / Beagle Human / n.a.	*in vitro* / LSC	[^{14}C]darolutamide	R-9664[b]	4.2.2.3.1
Plasma protein binding	Rat / Wistar Dog / Beagle Monkey / Cynomolgus Human / n.a.	*in vitro* / LC-MS/MS	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	R-9729[b]	4.2.2.3.2

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies (continued)

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Distribution (continued)					
Plasma protein binding	Mouse / CD-1 Mouse / Balb/c Rat / Wistar Dog / Beagle Human / n.a.	*in vitro* / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-9883[b]	4.2.2.3.3
Plasma protein binding	Monkey / Cynomolgus Minipig / Göttingen	*in vitro* / LSC	[^{14}C]darolutamide [^{14}C]keto-darolutamide	PH-39986	4.2.2.3.4
Single dose tissue distribution	Rat / Wistar Rat / Long Evans	PO / WBA	[^{14}C]darolutamide	R-9747[d]	4.2.2.3.5
Metabolism					
Hepatocytes stability	Mouse / Balb/c Dog / Beagle Minipig / Göttingen Monkey / Cynomolgus Human / n.a.	*in vitro* / hepatocytes LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	R-11056[a]	4.2.2.4.1
Hepatocytes stability	Human / n.a. Rat / Wistar HepaRG cell line	*in vitro* / hepatocytes LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	R-9988[a]	4.2.2.4.2
Metabolism in Hepatocytes	Human / n.a. Dog / Beagle Rat / Wistar Mouse / CD-1 Mouse / Balb/c	*in vitro* / hepatocytes HPLC-radiodetection LC-MS/MS	[^{14}C]darolutamide	R-9989[a]	4.2.2.4.3

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies (continued)

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Metabolism (continued)					
Structure elucidation	n.a / n.a.	*in vitro* / liver microsomes hepatocytes recombinant CYP enzymes LC-MS/MS, NMR HPLC-radiodetection	Darolutamide [^{14}C]darolutamide	PH-39883	4.2.2.4.4
Enzymes involved	Human / n.a	in vitro / liver microsomes recombinant CYP isoforms / LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	PH-40290	4.2.2.4.5
UGT Phenotyping	Human / n.a	in vitro / HLM (pool) HIM (pool) HRM (pool) Human UGT supersomes / HPLC-LSC, LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	PH-40077	4.2.2.4.6
AKR Phenotyping ADH Phenotyping	Human / n.a.	in vitro / Human liver microsomes Human liver cytosol Recombinant AKR isoforms Recombinant ADH isoforms / LC-MS/MS	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	R-9722[h]	4.2.2.4.7
Enzyme inhibition CYP	Human / n.a.	in vitro / liver microsomes / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9943[i]	4.2.2.4.8

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies (continued)

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Metabolism (continued)					
Enzyme inhibition CYP	Human / n.a.	in vitro / liver microsomes / LC-MS/MS	Keto-darolutamide	R-9948[i]	4.2.2.4.9
Enzyme inhibition CYP	Human / n.a.	in vitro / liver microsomes / LC-MS/MS	Darolutamide	PH-39981	4.2.2.4.10
Enzyme inhibition CYP	Human / n.a.	in vitro / liver microsomes / LC-MS/MS	Keto-darolutamide	PH-39983	4.2.2.4.11
Enzyme inhibition CYP	Human / n.a.	in vitro / liver microsomes recombinant enzyme / LC-MS/MS	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	PH-39984	4.2.2.4.12
Enzyme inhibition UGT	Human / n.a.	in vitro / liver microsomes LC-MS/MS	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	R-11222[d]	4.2.2.4.13
Enzyme inhibition DPD	Human / n.a.	in vitro / liver cytosol / LC-MS/MS	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	PH-40239	4.2.2.4.14
Enzyme induction CYP	Human / n.a.	in vitro / hepatocytes / LC-MS/MS, qPCR	Darolutamide (*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	PH-40105	4.2.2.4.15

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies (continued)

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Metabolism (continued)					
Metabolism in vivo	Rat / Wistar	IV + PO/ LSC	[^{14}C]darolutamide	R-9727[b]	4.2.2.4.16
Metabolism in vivo	Rat / Wistar bdc	IV + PO / LSC LC-MS/MS	[^{14}C]darolutamide	PH-39959	4.2.2.4.17
Metabolism in vivo	Human / Caucasian, Black	PO / HPLC-LSC	[^{14}C]darolutamide	PH-40075	4.2.2.4.18
Excretion					
Excretion	Rat / Wistar	IV + PO/ LSC	[^{14}C]darolutamide	R-9663[b]	4.2.2.5.1
Excretion	Rat / Wistar bdc	IV + PO / LSC LC-MS/MS	[^{14}C]darolutamide	PH-39959	4.2.2.4.17
Excretion	Human / Caucasian Black	PO / LSC	[^{14}C]darolutamide	PH-40075	4.2.2.4.18
Pharmacokinetic drug interactions					
n.a.					
Other PK studies					
Permeability	Caco-2 cells	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide	R-12272[e]	4.2.2.7.1
Permeability	Caco-2 cells	in vitro / LC-MS/MS	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide	R-12277[e]	4.2.2.7.2

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies (continued)

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Other PK studies (continued)					
Permeability	Caco-2 cells	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide	R-12064[e]	4.2.2.7.3
P-gp – substrate characteristics and inhibition	CPT-P1	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9662[e]	4.2.2.7.4
BCRP – substrate characteristics and inhibition	CPT-B1	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9662[e]	4.2.2.7.4
P-gp – substrate characteristics and inhibition	MDR1-MDCK	in vitro / LC-MS/MS	Keto-darolutamide	R-11874[e]	4.2.2.7.5
BCRP – substrate characteristics and inhibition	BCRP-MDCK	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11872[e]	4.2.2.7.6
OATP1B1 and OATP1B3 - substrate characteristics and inhibition	OATP1B1, OATP1B3 in HEK-cells	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide	R-9730[e]	4.2.2.7.7
OATP1B1 and OATP1B3 - substrate characteristics and inhibition	OATP1B1, OATP1B3 in HEK-cells	in vitro / LC-MS/MS	Keto-darolutamide	R-11866[e]	4.2.2.7.8
OCT1 - substrate characteristics	OCT1 in HEK-cells	in vitro / LSC	[^{14}C]darolutamide [^{14}C]keto-darolutamide	R-12199[f]	4.2.2.7.9
OCT2 - inhibition	OCT2 in HEK-cells	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11870[e]	4.2.2.7.10
MATE1 – inhibition	MATE1 in HEK-cells	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-12009[e]	4.2.2.7.11

All studies were performed at the Department of DMPK, Bayer AG, Germany unless otherwise mentioned

Test article: Darolutamide

Table 1-1: Overview on pharmacokinetic studies (continued)

Type of study	Species / strain	Route of administration / method	Administered compound	Report no.	Location
Other PK studies (continued)					
MATE2K – inhibition	MATE2K in HEK-cells	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11871[e]	4.2.2.7.12
OAT1, OAT3 – inhibition	OAT1 OAT3 in HEK-cells	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11868[e]	4.2.2.7.13
BSEP – inhibition	Human hepatocytes	in vitro / LC-MS/MS	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11099[g]	4.2.2.7.14
NTCP – inhibition	NTCP in HEK-cells	in vitro / LSC	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11918[f]	4.2.2.7.15
OATP2B1 – inhibition	OATP2B1 in HEK cells	in vitro / LSC	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11919[f]	4.2.2.7.16
MRP2 – inhibition	MRP2 in HEK cells	in vitro / Fluorescence detection	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11920[f]	4.2.2.7.17
OCT1 – inhibition	OCT1 in HEK-cells	in vitro / LSC	Darolutamide Keto-darolutamide	R-11921[f]	4.2.2.7.18

n.a. = not applicable
a = Orion Corporation Orion Pharma, Finland
b = [redacted], UK
c = [redacted]., The Netherlands
d = [redacted], UK
e = [redacted], USA
f = [redacted], Germany
g = [redacted], [redacted], USA
h = [redacted], UK
i = [redacted], The Netherlands

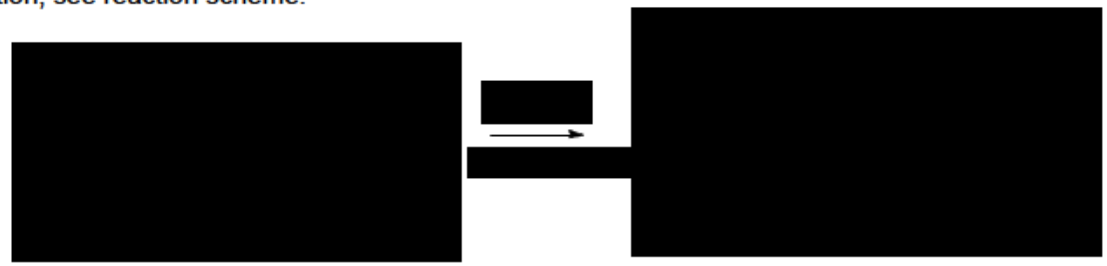
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

Test article: Darolutamide

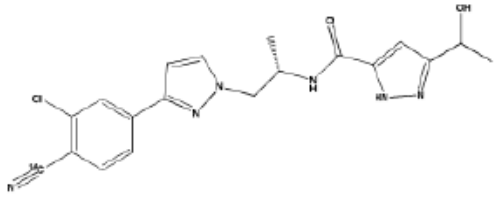
Table 2-1: Pharmacokinetics: Isotope Labeling Synthesis of Darolutamide

Location: 4.2.2.1.1
Report no.: R-11019

Chemical structure / labeling position, see reaction scheme:



2) Preparative HPLC purification



[14C]ODM-201

ODM-201 = darolutamide

Test article: Darolutamide

Table 2-2: Pharmacokinetics: Isotope Labeling Synthesis of Darolutamide

Location: 4.2.2.1.3
Report no.: PH-39708

Chemical structure / labeling position, see reaction scheme:



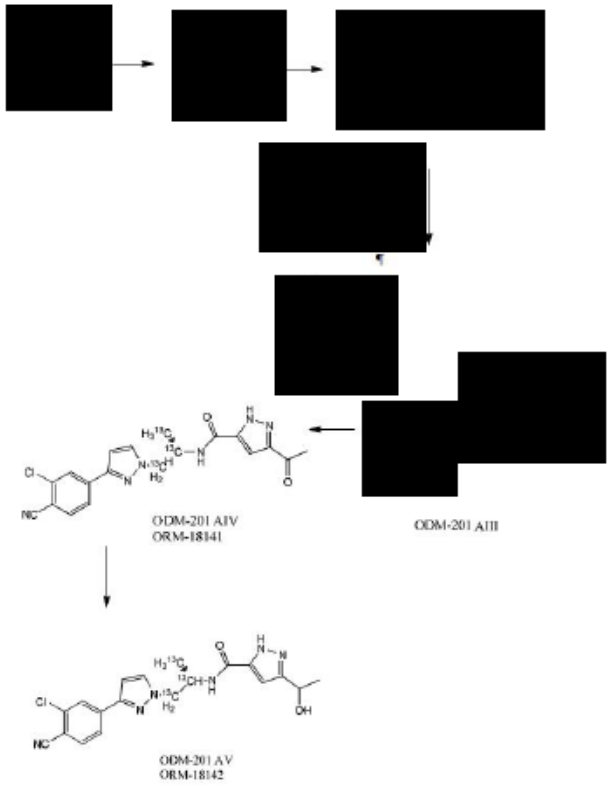
BAY 1841788 = darolutamide

Test article: Darolutamide

Table 2-3: Pharmacokinetics: Isotope Labeling Synthesis of Darolutamide and its Metabolite

Location: 4.2.2.1.2
Report no.: R-11020

Chemical structure / labeling position, see reaction scheme:



ODM-201=darolutamide, ORM-18142=[^{13}C]darolutamide, ORM-18141= [^{13}C]keto-darolutamide

Test article: Darolutamide

Table 2-4: Pharmacokinetics: Analytical Methods and Validation Reports

Overview on Bioanalytical Methods

Type of Study	Method	Analyte	Matrix	Testing Facility	Report no./ Location in CTD	Applied to studies study no.
Bioanalytical methods and validation for preclinical and toxicokinetic studies	Method no: 1168A/B Version 2 Solid Phase Extraction (SPE) followed by HPLC- separation and MS/MS-detection	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	Rat, dog plasma	[redacted], UK	R-9746/ 4.2.2.1.4	503175, 503182, 8278571, AB14461, AB14462, AB19526
Bioanalytical methods and validation for preclinical and toxicokinetic studies	Method no: 1168A/B Solid Phase Extraction (SPE) followed by HPLC- separation and MS/MS-detection	(*S*,*R*)-darolutamide (*S*,*S*)-darolutamide Keto-darolutamide	Rat, dog plasma	[redacted], UK	R-9912/ 4.2.2.1.5	517998, 518001, 8278571, AB14461, AB14462, AB19526, 20110265PCCPB, 20110266PCCPB, 791284 (protein binding study)
Bioanalytical methods and validation for preclinical and toxicokinetic studies	Method no: 1169A/B/C[a]/D[b] Solid Phase Extraction (SPE) followed by HPLC- separation and MS/MS-detection	Darolutamide Keto-darolutamide	Rat, dog, mouse, human plasma Rat, dog, mouse, human blood HSA, AGP, phosphate buffered saline	[redacted], UK	R-9977/ 4.2.2.1.6	192800 (Protein Binding study)

a = direct injection + LC-MS
b = sample dilution + LC-MS

2.6.5.3 薬物動態試験： 単回投与後の吸収

Test article: Darolutamide

Table 3-1: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, rodent

Location: 4.2.2.2.1
Report no.: PH-40003

Species / strain:				Rat / Wistar					
Admin. Compound:				**Darolutamide**					
Matrix:				Plasma					
Dose:	[mg/kg]			10					
Route:				intravenous					
Gender / No. of animals:				male / 4					
Feeding condition:				fasted					
Formulation:				50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)					
Duration:	[h]			24					
Assay:				LC-MS/MS					
Analyte		**Darolutamide[a]**		**(*S*,*R*)-darolutamide[b]**		**(*S*,*S*)-darolutamide[b]**		**Keto-darolutamide**	
Parameter	**Unit**	**gMean**	**gSD**	**gMean**	**gSD**	**gMean**	**gSD**	**gMean**	**gSD**
AUC	[ng·h/mL]	21600	1.35	12200	1.42	9410	1.27	21300	1.39
AUC_{norm}	[kg·h/L]	2.16	1.35	2.43	1.42	1.88	1.27	2.15	1.39
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	21600	1.35	12100	1.42	9360	1.27	21300	1.39
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	2.16	1.35	2.43	1.42	1.87	1.27	2.14	1.39
t_{last}[c]	[h]	24.0	24.0-24.0	24.0	24.0-24.0	24.0	24.0-24.0	24.0	24.0-24.0
C_{max}	[ng/mL]	17800	1.51	10100	1.52	7690	1.49	7090	1.55
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.78	1.51	2.03	1.52	1.54	1.49	0.713	1.55
t_{max}[c]	[h]	0.0333	0.0333-0.0333	0.0333	0.0333-0.0333	0.0333	0.0333-0.0333	0.250	0.0833-1.00
$t_{1/2}$	[h]	4.01	1.16	3.95	1.16	4.05	1.16	3.45	1.18
Range[d]	[h]	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0	8.00-24.0
MRT	[h]	2.51	1.12	2.11	1.14	3.02	1.10	2.81	1.10
CL	[L/(h·kg)]	0.462	1.35	0.411	1.42	0.531	1.27	n.c.	n.c.
V_{ss}	[L/kg]	1.16	1.45	0.867	1.50	1.61	1.36	n.c.	n.c.
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[e]		n.a.	n.a.	0.564	n.c.	0.436	n.c.	0.993	n.c.

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, b = dose of 5 mg/kg used for the diastereomers each for PK evaluation,
c = median and range shown instead of gMean and gSD, d = regression range shown instead of gMean and gSD, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide n.c. = not calculated, n.a. = not applicable, gMean = geometric mean, gSD = geometric SD

Test article: Darolutamide

Table 3-2: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, rodent

Location: 4.2.2.5.1
Report no.: R-9663

Species / strain:		Rat / Wistar
Admin. Compound:		[^{14}C]darolutamide
Matrix:		Plasma
Dose:	[mg/kg]	target: 10 / actual: 10.85[a]
Route:		oral
Gender / No. of animals:		male / 16 (2 / time point)
Feeding condition:		fasted
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Duration:	[h]	24
Assay:		LSC, LC-MS/MS

Analyte		**Total radioactivity**	**Darolutamide[b]**	**(*S*,*R*)-darolutamide[c]**	**(*S*,*S*)-darolutamide[c]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit[d]**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	71900	27200	14500	12700	20000
AUC_{norm}	[kg·h/L]	6.63	2.51	2.67	2.34	1.84
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	71300	27100	14400	12700	19900
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	6.57	2.50	2.65	2.34	1.83
t_{last}	[h]	24	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	15500	5880	3750	2130	3590
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.43	0.541	0.691	0.393	0.331
t_{max}	[h]	1	1	1	1	2
$t_{1/2}$	[h]	4.04	3.28	3.29	3.28	3.79
Range[e]	[h]	12.0 – 24.0	12.0 – 24.0	12.0 – 24.0	12.0 – 24.0	12.0 – 24.0
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[f]		n.a.	n.a.	0.53	0.47	0.73

a = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 3, b = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations,
c = dose of 5.425 mg/kg used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters, d = Data in ng equivalent/mL was used for total radioactivity analytes, e = regression range, f = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide.
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 3-3: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, non-rodent

Location: 4.2.2.2.2
Report no.: R-9661

Species / strain:		Dog / Beagle
Admin. compound:		**Darolutamide**
Matrix:		Plasma
Dose:	[mg/kg]	target: 3 / actual 2.7
Route:		intravenous bolus
Gender / No. of animals:		male / 2
Feeding condition:		food 4 h after dosing (fasted)
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Duration:	[h]	30
Assay:		LC-MS/MS

Analyte		**Darolutamide[a] Arithmetic mean**	**(*S*,*R*)-darolutamide[b] Arithmetic mean**	**(*S*,*S*)-darolutamide[b] Arithmetic mean**	**Keto-darolutamide Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	15081	12938	2146	15111
AUC_{norm}	[kg·h/L]	5.59	9.58	1.59	5.60
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	14291	12184	2081	14386
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	5.29	9.03	1.54	5.33
t_{last}[c]	[h]	30	30	12-30	30
C_{max}	[ng/mL]	3680	2170	1510	1690
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.36	1.61	1.12	0.626
t_{max}	[h]	0.08	0.08	0.08	0.5
$t_{1/2}$	[h]	6.6	6.8	4.5	7.9
Range[d]	[h]	2-30	2-30	2/8-12/30	1/8-30
CL	[L/(h·kg)]	0.19	0.11	0.70	n.a.
V_{ss}	[L/kg]	1.42	0.89	2.61	n.a.
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[e]		n.a.	0.85	0.15	1.0

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, b = dose of 1.35 mg/kg used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters, c = range shown instead of mean, d = regression range shown instead of mean, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide; metabolic ratio in case of keto-darolutamide
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 3-4: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, non-rodent

Location: 4.2.2.2.2
Report no.: R-9661

Species / strain:		Dog / Beagle			
Admin. compound:		**Darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:	[mg/kg]	100			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 2			
Feeding condition:		food 4 h after dosing (fasted)		food 0.5 h before dosing (fed)	
Formulation:		0.5% methylcellulose + 0.5% Tween 80			
Duration:	[h]	28			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**Darolutamide Arithmetic mean**	**Keto-darolutamide Arithmetic mean**	**Darolutamide Arithmetic mean**	**Keto-darolutamide Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	82600[c]	54700[c]	95300	110000
AUC_{norm}	[kg·h/L]	0.826[c]	0.547[c]	0.953	1.10
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	66600	77800	86300	101000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	0.666	0.778	0.863	1.01
t_{last}	[h]	28	28	28	28
C_{max}	[ng/mL]	4290	4890	5690	8090
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.0429	0.0489	0.0569	0.0809
t_{max}	[h]	18	18	5	3
$t_{1/2}$	[h]	11.4[c]	9.1	7.3	6.9
Range[d]	[h]	20-28[c]	20-28[c]	12-28	8/16-28
F[a]	[%]	12.6	n.a.[c]	16.3	n.a.
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[b]		n.a.	1.2	n.a.	1.2

a = mean of n=2 animals, calculated from $AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$
b = metabolic ratio in case of keto-darolutamide
c = n = 1
d = regression range
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 3-5: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, non-rodent

Location: 4.2.2.2.3
Report no.: R-9733

Species / strain:		Dog / Beagle
Admin. compound:		**(*S*,*R*)-darolutamide**
Matrix:		Plasma
Dose:	[mg/kg]	3
Route:		intravenous bolus
Gender / No. of animals:		male / 2
Feeding condition:		fed
Formulation:		40% PEG400, 20% propyleneglycol, 40% glucose solution (5%) (v/v/v)
Duration:	[h]	24
Assay:		LC-MS/MS

Analyte		**Darolutamide[a]**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	55100[b]	53700[b]	n.a.	11700[b]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	18.4[b]	17.9[b]	n.a.	3.90
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	44300	42900	474	9470
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	14.8	14.3	n.a.	3.16
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C(0)	[ng/mL]	n.a.	6970	n.a.	n.a.
C_{max}	[ng/mL]	7140	n.a.	40	781
$C_{max,norm}$	[kg/L]	2.38	n.a.	n.a.	0.260
C_{last}	[ng/mL]	657	650	6.56	154
t_{max}[c]	[h]	0.083-0.25	n.a.	3-5	1.5-3
$t_{1/2}$	[h]	11.1[b]	11.2[b]	n.a.	10.0[b]
Range[d]	[h]	5-24	5-24	n.a.	5-24
CL	[mL/(h·kg)]	n.a.	62.0[b]	n.a.	n.a.
V_z	[mL/kg]	n.a.	973[b]	n.a.	n.a.
V_{ss}	[mL/kg]	n.a.	837[b]	n.a.	n.a.
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[e]		n.a.	0.99	0.01	0.21

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, b = approximation due to extrapolation more than 15% of the total AUC, c = shown as range, d = regression range instead of mean, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide, n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 3-6: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, non-rodent

Location: 4.2.2.2.3
Report no.: R-9733

Species / strain:		Dog / Beagle
Admin. compound:		**(*S*,*S*)-darolutamide**
Matrix:		Plasma
Dose:	[mg/kg]	3
Route:		intravenous bolus
Gender / No. of animals:		male / 2
Feeding condition:		fed
Formulation:		40% PEG400, 20% propyleneglycol, 40% glucose solution (5%) (v/v/v)
Duration:	[h]	24
Assay:		LC-MS/MS

Analyte **Parameter**	**Unit**	**Darolutamide[a]** **Arithmetic mean**	**(*S*,*R*)-darolutamide** **Arithmetic mean**	**(*S*,*S*)-darolutamide** **Arithmetic mean**	**Keto-darolutamide** **Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	5270[b]	1120[b]	4050	28000[b]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	1.76[b]	n.a.	1.35	9.33[b]
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	5050	893	3980	27000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	1.68	n.a.	1.33	9.01
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C(0)	[ng/mL]	n.a.	n.a.	7250	n.a.
C_{max}	[ng/mL]	4870	65.2	n.a.	4000
$C_{max,norm}$	[kg/L]	1.62	n.a.	n.a.	1.33
C_{last}	[ng/mL]	27.0	15.8	11.2	128
t_{max}[c]	[h]	0.033	3	n.a.	0.5-1.5
$t_{1/2}$	[h]	5.72[b]	10.2[b]	4.47	5.16[b]
Range[d]	[h]	3-24	5-24	3-24	5-24
CL	[mL/(h·kg)]	n.a.	n.a.	854	n.a.
V_z	[mL/kg]	n.a.	n.a.	5530	n.a.
V_{ss}	[mL/kg]	n.a.	n.a.	3780	n.a.
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[e]		n.a.	0.18	0.82	5.3

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, b = approximation due to extrapolation more than 15% of the total AUC, c = shown as range, d = regression range instead of mean, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide, n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 3-7: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, non-rodent

Location: 4.2.2.2.3
Report no.: R-9733

Species / strain:		Dog / Beagle			
Admin. compound:		**(*S*,*R*)-darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		300 mg/animal (about 25.3 mg/kg)			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 4			
Feeding condition:		fed			
Formulation:		powder in gelatin capsule			
Duration:	[h]	24			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**Darolutamide[a]**	**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	133000[bf]	131000[b]	1840[b]	35900[bf]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	5.49[bf]	5.43[b]	n.a.	1.38[bf]
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	92200	91200	1060	21900
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	3.60	3.55	n.a.	0.858
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	7390	7370	82.4	1380
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.290	0.289	n.a.	0.0535
t_{max}[c]	[h]	1.5-3	1.5-3	5-8	2-12
$t_{1/2}$	[h]	17.1[bf]	17.2[b]	11.8[b]	13.9[bf]
Range[d]	[h]	3 / 8-24[f]	3 / 8-24	8-24	3 / 5 / 8-24[f]
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[e]		n.a.	0.99	0.01	0.24

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, b = approximation due to extrapolation more than 15% of the total AUC, c = shown as range, d = regression range instead of mean, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide, f = mean of 3 animals
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 3-8: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, non-rodent

Location: 4.2.2.2.3
Report no.: R-9733

Species / strain:		Dog / Beagle			
Admin. compound:		**(*S*,*S*)-darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		300 mg/animal (about 25.1 mg/kg)			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 4			
Feeding condition:		fed			
Formulation:		powder in gelatin capsule			
Duration:	[h]	24			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte **Parameter**	**Unit**	**Darolutamide[a]** **Arithmetic mean**	**(*S*,*R*)-darolutamide** **Arithmetic mean**	**(*S*,*S*)-darolutamide** **Arithmetic mean**	**Keto-darolutamide** **Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	22400[b]	n.a.	12000[f]	88400[b]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	0.878[b]	n.a.	0.500[f]	3.50[b]
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	19100	3690	15400	80900
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	0.746	n.a.	0.597	3.20
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	2230	244	2170	11600
$C_{max, norm}$	[kg/L]	0.0881	n.a.	0.0855	0.462
t_{max}[c]	[h]	0.25-1.5	5-12	0.25-1.5	1.5
$t_{1/2}$	[h]	9.20[b]	n.a.	5.82[f]	7.44[b]
Range[d]	[h]	5-24	n.a.	5/8-24	5/8-24
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[e]		n.a.	0.19	0.81	4.2

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, b = approximation due to extrapolation more than 15% of the total AUC, c = shown as range, d = regression range shown instead of mean, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide, f = mean of 3 animals
n.a. = not applicable,

Test article: Darolutamide

Table 3-9: Pharmacokinetics: Absorption / basic PK after a single dose, non-rodent

Location: 4.2.2.2.3
Report no.: R-9733

Species / strain:			Dog / Beagle		
Admin. compound:			**Darolutamide**		
Matrix:			Plasma		
Dose:			300 mg/animal (about 25.3 mg/kg)		
Route:			oral		
Gender / No. of animals:			male / 4		
Feeding condition:			fed		
Formulation:			powder in gelatin capsule		
Duration:	[h]		24		
Assay:			LC-MS/MS		
Analyte		**Darolutamide[a]**	**(*S*,*R*)-darolutamide[f]**	**(*S*,*S*)-darolutamide[f]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**	**Arithmetic mean**
AUC	[ng·h/mL]	67900[bg]	65900[bg]	6580[b]	47200[b]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	2.79[bg]	5.41[bg]	0.501[b]	1.83[b]
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	57400	51500	5980	36000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	2.19	3.93	0.454	1.38
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	3510	3110	1130	2840
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.136	0.241	0.0855	0.111
t_{max}[c]	[h]	2-12	2-12	0.25-0.5	1.5-3
$t_{1/2}$	[h]	16.6[bg]	19.5[bg]	8.11[b]	14.5[b]
Range[d]	[h]	5-24[g]	5/8-24[g]	8-24	8-24
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[e]		n.a.	0.90	0.10	0.63

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, b = approximation due to extrapolation more than 15% of the total AUC, c = shown as range, d = regression range instead of mean, e = diastereomer ratio in case of (*S*,*R)*-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide, f = 50% of individual dose used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters, g = mean of 2 animals
n.a. = not applicable

2.6.5.4 薬物動態試験： 反復投与後の吸収

反復投与後のトキシコキネティクスは 2.6.7.3 を参照。

Test article: Darolutamide

Table 4-1: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:	Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)
Admin. compound:	**Darolutamide**
Matrix:	Plasma
Dose:	2 x 25 mg/kg/d for 7 days
Route:	oral
Gender / No. of animals:	male / 55 (5 / time point)
Feeding condition:	ad libitum
Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Duration:	7 days
Assay:	LC-MS/MS

Analyte		**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide[b]**	**(*S*,*S*)-darolutamide[b]**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC	[ng·h/mL]	108631	235102	89751	18879
AUC_{norm}	[kg·h/L]	2.173	4.702	3.590	0.755
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	108618	234181	89742	18876
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	2.172	4.683	3.590	0.755
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	27608	33760	22240	5368
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.552	0.675	0.890	0.215
C_{last}	[ng/mL]	6	29	5	1
t_{max}	[h]	8.5	10	8.5	8.5
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[c]		n.a.	2.2	0.8	0.2

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = dose of 25 mg/kg used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-2: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)			
Admin. compound:		**Darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		2 x 100 mg/kg/d for 7 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 55 (5 / time point)			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		50% PEG300, 30% propylene glycol, 20% glucosteril (v/v/v)			
Duration:		7 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**	**(*S*,*R*)-darolutamide[b]**	**(*S*,*S*)-darolutamide[b]**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC	[ng·h/mL]	228700	780827	169215	59512
AUC_{norm}	[kg·h/L]	1.144	3.904	1.692	0.595
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	224876	763071	166096	58780
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	1.124	3.815	1.661	0.588
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	57740	98660	39420	18320
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.289	0.493	0.394	0.183
C_{last}	[ng/mL]	1012	3930	803	210
t_{max}	[h]	8.5	10	8.5	8.5
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[c]		n.a.	3.4	0.7	0.3

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = dose of 100 mg/kg used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide, metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-3: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Darolutamide[a]				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 25 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	2026	58751	104878	302705	27399
t_{last}	[h]	24	24	24	24	12
C_{max}	[ng/g]	427	15930	16550	78000	6130
C_{last}	[ng/g]	3	4	11	12	739
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
Ratio tissue/plasma[b]		0.02	0.54	0.97	2.79	0.25

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer concentrations
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-4: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Darolutamide[a]				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 100 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix:		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	6197	113139	308374	1002264	93420
t_{last}	[h]	24	24	24	24	24
C_{max}	[ng/g]	1401	17920	78500	220800	20830
C_{last}	[ng/g]	13	283	932	1703	160
t_{max}	[h]	8.5	0.5	8.5	8.5	8.5
Ratio tissue/plasma[b]		0.03	0.50	1.37	4.46	0.42

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer concentrations
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-5: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*R*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 25 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	1412	40940	81875	212057	15971
t_{last}	[h]	24	24	24	24	12
C_{max}	[ng/g]	290	10700	11600	52100	4060
C_{last}	[ng/g]	2	3	8	7.92	553
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
MR AUC(0-t_{last})[a]		0.7	0.7	0.8	0.7	0.6
Ratio tissue/plasma[b]		0.02	0.46	0.91	2.36	0.18

a = diastereomer ratio for (*S*,*R*)-darolutamide
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-6: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*R*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 100 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propylene glycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matri		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	3720	72972	211185	602655	57482
t_{last}	[h]	24	24	24	24	24
C_{max}	[ng/g]	819	13000	51500	124000	12300
C_{last}	[ng/g]	9	193	714	1080	104
t_{max}	[h]	8.5	0.5	8.5	8.5	8.5
MR AUC[a]		0.6	0.6	0.7	0.6	0.6
Ratio tissue/plasma[b]		0.02	0.44	1.27	3.63	0.35

a = diastereomer ratio for (*S*,*R*)-darolutamide
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-7: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*S*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 25 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	614	17811	23003	90648	6994
t_{last}	[h]	24	24	24	24	12
C_{max}	[ng/g]	137	5230	4950	25900	2070
C_{last}	[ng/g]	1	1	3	4	186
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
MR AUC(0-t_{last})[a]		0.3	0.3	0.2	0.3	0.3
Ratio tissue/plasma[b]		0.03	0.94	1.22	4.80	0.37

a = diastereomer ratio for (*S*,*S*)-darolutamide
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-8: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*S*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 100 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	2477	40167	97189	399609	35938
t_{last}	[h]	24	24	24	24	24
C_{max}	[ng/g]	582	6130	27000	96800	8530
C_{last}	[ng/g]	4	90	218	623	56
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
MR AUC(0-t_{last})[a]		0.4	0.4	0.3	0.4	0.4
Ratio tissue/plasma[b]		0.04	0.68	1.65	6.80	0.61

a = diastereomer ratio for (*S*,*S*)-darolutamide
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-9: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Keto-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 25 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	4563	55779	57689	76457	19148
t_{last}	[h]	24	24	24	24	12
C_{max}	[ng/g]	637	8370	5960	12600	4330
C_{last}	[ng/g]	11	3	6	5.12	1040
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
MR AUC(0-t_{last})[a]		2.3	0.9	0.6	0.3	0.7
Ratio tissue/plasma[b]		0.02	0.24	0.25	0.33	0.08

a = metabolite ratio
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-10: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.5
Report no.: R-9919

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Keto-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 100 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Brain**	**Heart**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/g]	18224	165888	204994	439955	114941
t_{last}	[h]	24	24	24	24	24
C_{max}	[ng/g]	2920	20800	28600	58200	15300
C_{last}	[ng/g]	47	464	751	702	213
t_{max}	[h]	8.5	0.5	8.5	8.5	8.5
MR AUC(0-t_{last})[a]		2.9	1.5	0.7	0.4	1.2
Ratio tissue/plasma[b]		0.02	0.22	0.27	0.58	0.15

a = metabolite ratio
b = ratio based on AUC(0-t_{last})

Test article: Darolutamide

Table 4-11: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Darolutamide[a]				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		50 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (plasma: 5 / time point), 25 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	109479	2377	107248	421294	44566
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	28896	390	28520	85100	6730
t_{max}	[h]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	1.01	87.3	7.02	6.82	1377
t_{last}	[h]	24	8	24	24	8
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.4	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Ratio tissue/plasma[c]		n.a.	0.02	0.98	3.85	0.41

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer concentrations
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-12: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*R*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		50 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (plasma: 5 / time point), 25 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	88416	1598	84073	312131	30938
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	21980	259	19400	56900	4530
t_{max}	[h]	0.5	0.5	0.5	0.5	2
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	1.01	57.9	7.02	6.82	969
t_{last}	[h]	24	8	24	24	8
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.4	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MR AUC(0-t_{last})[a]		0.81	0.67	0.78	0.74	0.69
Ratio tissue/plasma[c]		n.a.	0.02	0.95	3.53	0.35

a = diastereomer ratio
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-13: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*S*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		50 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 35 (plasma: 5 / time point), 25 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	21063	779	23176	109163	13628
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	7410	131	9120	28200	2270
t_{max}	[h]	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	47.5	29.4	469	2790	408
t_{last}	[h]	12	8	8	8	8
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.3	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MR AUC(0-t_{last})[a]		0.19	0.33	0.22	0.26	0.31
Ratio tissue/plasma[c]		n.a.	0.04	1.10	5.18	0.65

a = diastereomer ratio
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-14: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:	Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)
Admin. compound:	**Darolutamide**
Analyte:	Keto-darolutamide
Matrix:	Organ tissue (see below)
Dose:	50 mg/kg/d for 7 days
Route:	oral
Gender / No. of animals:	male / 35 (plasma: 5 / time point), 25 (organs: 5 / time point) pool
Feeding condition:	ad libitum
Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Duration:	7 days
Assay:	LC-MS/MS

Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	279632	6486	84564	123283	41835
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	38020	1010	11400	14600	6680
t_{max}	[h]	0.5	0.5	0.5	0.5	2
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	5.04	249	17.5	4830	1510
t_{last}	[h]	24	8	24	8	8
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.4	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MR AUC(0-t_{last})[a]		2.6	2.7	0.8	0.3	0.9
Ratio tissue/plasma		n.a.	0.02	0.30	0.44	0.15

a = metabolite ratio
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-15: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Darolutamide[a]				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 50 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 55 (plasma: 5 / time point), 35 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	174807	6819	288484	748168	97256
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	42712	1243	56900	124700	14780
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	53.5	343	66.5	219	21.5
t_{last}	[h]	24	12	24	24	24
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.6	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
Ratio tissue/plasma[c]		n.a.	0.04	1.65	4.28	0.56

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer concentrations
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-16: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:	Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)
Admin. compound:	**Darolutamide**
Analyte:	(*S*,*R*)-darolutamide
Matrix:	Organ tissue (see below)
Dose:	2 x 50 mg/kg/d for 7 days
Route:	oral
Gender / No. of animals:	male / 55 (plasma: 5 / time point), 35 (organs: 5 / time point) pool
Feeding condition:	ad libitum
Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)
Duration:	7 days
Assay:	LC-MS/MS

Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	133263	4278	214735	495309	62952
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	30820	750	40100	77800	9180
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	41.7	219	50.8	143	12.7
t_{last}	[h]	24	12	24	24	24
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.6	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MR AUC(0-t_{last})[a]		0.76	0.63	0.74	0.66	0.65
Ratio tissue/plasma[c]		n.a.	0.03	1.61	3.72	0.47

a =diastereomer ratio
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-17: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*S*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 50 mg/kg/d for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 55 (plasma: 5 / time point), 35 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	41544	2541	73749	252859	34304
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	11892	493	16800	46900	5600
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	11.9	124	15.7	75.5	8.83
t_{last}	[h]	24	12	24	24	24
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.6	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MR AUC(0-t_{last})[a]		0.24	0.37	0.26	0.34	0.35
Ratio tissue/plasma		n.a.	0.06	1.78	6.09	0.83

a = diastereomer ratio
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-18: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Keto-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		2 x 50 mg/kg for 7 days				
Route:		oral				
Gender / No. of animals:		male / 55 (plasma: 5 / time point), 35 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)				
Duration:		7 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Parameter	**Unit**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**	**Day 7**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL] / [ng·h/g]	533522	14807	185918	290469	93502
C_{max}	[ng/mL] / [ng/g]	66900	1740	16200	25600	10100
t_{max}	[h]	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
C_{last}	[ng/mL] / [ng/g]	301	814	95.3	95.9	5300
t_{last}	[h]	24	12	24	24	12
$t_{1/2}$[b]	[h]	1.8	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MR AUC(0-t_{last})[a]		3.1	2.2	0.6	0.4	1.0
Ratio tissue/plasma[c]		n.a.	0.03	0.35	0.54	0.18

a = metabolite ratio
b = $t_{1/2}$ is only a rough estimate
c = ratio based on AUC(0-t_{last})
n.a. = not applicable
n.c. = not calculated

Test article: Darolutamide

Table 4-19: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Darolutamide[a]				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		50 mg/kg/d for 14 days				
Route:		subcutaneous				
Gender / No. of animals:		male / 15 (plasma: 5 / time point), 15 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		60% PEG300, 40% DMSO (v/v)				
Duration:		14 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Day 7						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	1022	24	1057	2948	310
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.02	1	2.9	0.3
Day 10						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	1001	15	1376	3371	32500
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.01	1.4	3.4	32.5
Day 14						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	1393	40	2054	5320	465
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.03	1.5	3.8	0.3

a = calculated from sum of diastereomer concentrations
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-20: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*R*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		50 mg/kg/d for 14 days				
Route:		subcutaneous				
Gender / No. of animals:		male / 15 (plasma: 5 / time point), 15 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		60% PEG300, 40% DMSO (v/v)				
Duration:		14 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Day 7						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	871	18	934	2390	214
Diastereomer ratio		0.85	0.74	0.88	0.81	0.69
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.02	1.1	2.7	0.2
Day 10						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	835	11	1180	2690	16200
Diastereomer ratio		0.83	0.72	0.86	0.80	0.50
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.01	1.4	3.2	19.4
Day 14						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	1139	26	1740	4240	330
Diastereomer ratio		0.82	0.65	0.85	0.80	0.71
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.02	1.5	3.7	0.3

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-21: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		(*S*,*S*)-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		50 mg/kg/d for 14 days				
Route:		subcutaneous				
Gender / No. of animals:		male / 15 (plasma: 5 / time point), 15 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		60% PEG300, 40% DMSO (v/v)				
Duration:		14 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Day 7						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	151	6	123	558	96
Diastereomer ratio		0.15	0.26	0.12	0.19	0.31
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.04	0.8	3.7	0.6
Day 10						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	166	4	196	681	16300
Diastereomer ratio		0.17	0.28	0.14	0.20	0.50
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.02	1.2	4.1	98.0
Day 14						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	254	14	314	1080	135
Diastereomer ratio		0.18	0.35	0.15	0.20	0.29
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.05	1.2	4.2	0.5

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-22: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.4
Report no.: R-9723

Species / strain:		Mouse / Balb/c nu (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl)				
Admin. compound:		**Darolutamide**				
Analyte:		Keto-darolutamide				
Matrix:		Organ tissue (see below)				
Dose:		50 mg/kg/d for 14 days				
Route:		subcutaneous				
Gender / No. of animals:		male / 15 (plasma: 5 / time point), 15 (organs: 5 / time point) pool				
Feeding condition:		ad libitum				
Formulation:		60% PEG300, 40% DMSO (v/v)				
Duration:		14 days				
Assay:		LC-MS/MS				
Matrix		**Plasma**	**Brain**	**Kidney**	**Liver**	**Prostate**
Day 7						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	2545	32	767	948	199
Metabolite ratio		2.5	1.3	0.7	0.3	0.6
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.01	0.3	0.4	0.1
Day 10						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	1626	20	659	816	169
Metabolite ratio		1.6	1.4	0.5	0.2	0.01
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.01	0.4	0.5	0.1
Day 14						
Concentration	[ng/mL] / [ng/g]	2339	53	953	1160	204
Metabolite ratio		1.7	1.3	0.5	0.2	0.4
Tissue/plasma ratio		n.a.	0.02	0.4	0.5	0.1

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-23: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.6
Report no.: R-9881

Species / strain:		Rat / Wistar Crl:WI(Han)			
Admin. compound:		**Darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		100 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 8			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Darolutamide[c]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 1**	**Day 1**	**Day 1**	**Day 1**
AUC	[ng·h/mL]	161000[b]	n.c.	325000	335000[b]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	3.22[b]	n.c.	3.25	3.35[b]
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/mL]	156000	156000	312000	317000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	3.12	3.12	3.12	3.17
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	14600	10400	21100	23000
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.292	0.208	0.211	0.230
t_{max}	[h]	0.50	8.0	0.50	3.0
$t_{1/2}$	[h]	4.60[b]	n.c.	5.13	5.69[b]
Range[e]	[h]	5 – 24	n.c.	5 - 24	5 - 24
MR C_{max}[d]		0.69	0.49	n.a.	1.1
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[d]		0.50	0.50	n.a.	1.0

a = dose of 50 mg/kg used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters, b = approximation due to calculation not to meet requirements, c = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations, d = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide, e = regression range
n.c. = not calculated (for concentration time profile no lambda z estimation possible), n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-24: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.6
Report no.: R-9881

Species / strain:		Rat / Wistar Crl:WI(Han)			
Admin. compound:		**Darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		100 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 8			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide[d]**	**(*S*,*S*)-darolutamide[d]**	**Darolutamide[b]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL]	103000	147000	250000	355000
AUC(0-t_{last})$_{norm}$	[kg·h/L]	2.06	2.94	2.50	3.55
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	9790	9650	18600	25800
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.196	0.193	0.186	0.258
t_{max}	[h]	0.50	5.0	3.0	3.0
$t_{1/2}$	[h]	3.73[a]	n.a.	3.69	3.83[a]
MR AUC(0-t_{last})[c]		0.41	0.59	n.a.	1.4

a = approximation due to calculation not to meet requirements
b = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide
d = dose of 50 mg/kg used for the diastereomers each for dose normalized PK parameters,
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-25: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.6
Report no.: R-9881

Species / strain:		Rat / Wistar Crl:WI(Han)			
Admin. compound:		**(*S*,*R*)-darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		50 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 8			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 1**	**Day 1**	**Day 1**	**Day 1**
AUC	[ng·h /mL]	258000	n.c.	n.c.	n.c.
AUC_{norm}	[kg·h/L]	5.16	n.a.	n.c.	n.c.
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h /mL]	256000	81200	337000	170000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	5.12	n.a.	6.74	3.40
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	18200	6400	23600	12400
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.364	n.a.	0.472	0.247
t_{max}	[h]	0.50	8.0	8.0	8.0
$t_{1/2}$	[h]	3.58	n.c.	n.c.	n.c.
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[b]		0.76	0.24	n.a.	0.50

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.c. = not calculated, n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-26: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.6
Report no.: R-9881

Species / strain:		Rat / Wistar Crl:WI(Han)			
Admin. compound:		**(*S*,*R*)-darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		50 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 8			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL]	159000	69100	228000	144000
AUC(0-t_{last})$_{norm}$	[kg·h/L]	3.18	n.a.	4.56	2.88
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	12700	5250	16300	10600
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.254	n.a.	0.326	0.212
t_{max}	[h]	3.0	8.0	3.0	3.0
$t_{1/2}$	[h]	2.87	n.c.	2.97[b]	3.31[b]
MR AUC(0-t_{last})[c]		0.70	0.30	n.a.	0.63

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = approximation due to calculation not to meet requirements
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.c. = not calculated, n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-27: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.6
Report no.: R-9881

Species / strain:		Rat / Wistar Crl:WI(Han)			
Admin. compound:		**(*S*,*S*)-darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		50 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 8			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 1**	**Day 1**	**Day 1**	**Day 1**
AUC	[ng·h/mL]	11500[b]	147000	158000[b]	219000[b]
AUC_{norm}	[kg·h/L]	n.a.	2.94	3.16[b]	4.38[b]
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[ng·h/L]	11400	146000	157000	218000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	n.a.	2.92	3.14	4.36
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	798	12100	12900	25900
$C_{max,norm}$	[kg/L]	n.a.	0.242	0.258	0.518
t_{max}	[h]	0.50	0.50	0.50	0.50
$t_{1/2}$	[h]	3.10[b]	3.24	3.22[b]	3.09[b]
MR $AUC(0\text{-}t_{last})$[c]		0.07	0.93	n.a.	1.4

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = approximation due to calculation not to meet requirements
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-28: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.6
Report no.: R-9881

Species / strain:		Rat / Wistar Crl:WI(Han)			
Admin. compound:		**(*S*,*S*)-darolutamide**			
Matrix:		Plasma			
Dose:		50 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 8			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		65% PEG400, 35% propyleneglycol (v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL]	4550	92200	96700	172000
AUC(0-t_{last})$_{norm}$	[kg·h/L]	n.a.	1.84	1.93	3.44
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	515	8880	9280	18500
$C_{max,norm}$	[kg/L]	n.a.	0.178	0.186	0.370
t_{max}	[h]	5.0	2.0	2.0	2.0
$t_{1/2}$	[h]	n.a.	3.44	3.46[b]	3.74[b]
MR AUC(0-t_{last})[c]		0.05	0.95	n.a.	1.8

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = approximation due to calculation not to meet requirements
c = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-29: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.7
Report no.: R-9976

Species / strain:		Rat / Hsd:SD (juvenile, 18-21 days)			
Admin. compound:		**Darolutamide**			
Dose:		100 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 28 (4 / time point)			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Matrix:		Plasma			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL]	95749	99130	194879	177964
C_{last}	[ng/mL]	152	156	308	469
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	9400	8255	16808	17500
t_{max}	[h]	2	5	2	5
MR AUC(0-t_{last})[b]		0.49	0.51	n.a.	0.91

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 4-30: Pharmacokinetics: PK after a repeated dose, rodent

Location: 4.2.2.2.7
Report no.: R-9976

Species / strain:		Rat / Hsd:SD (juvenile, 18-21 days)			
Admin. compound:		**Darolutamide**			
Dose:		100 mg/kg/d for 6 days			
Route:		oral			
Gender / No. of animals:		male / 28 (4 / time point)			
Feeding condition:		ad libitum			
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)			
Duration:		6 days			
Assay:		LC-MS/MS			
Matrix:		Prostate			
Analyte		**(*S*,*R*)-darolutamide**	**(*S*,*S*)-darolutamide**	**Darolutamide[a]**	**Keto-darolutamide**
Parameter	**Unit**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**	**Day 6**
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL]	46578	92128	138702	21190
C_{last}	[ng/mL]	82.5	171	253	49.4
t_{last}	[h]	24	24	24	24
C_{max}	[ng/mL]	4800	7900	11550	2050
t_{max}	[h]	2	5	2	5
MR AUC(0-t_{last})[b]		0.34	0.66	n.a.	0.15
Ratio prostate/plasma		0.49	0.93	0.71	0.12

a = PK parameters calculated from sum of diastereomer plasma concentrations
b = diastereomer ratio in case of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide or metabolite ratio in case of keto-darolutamide
n.a. = not applicable

2.6.5.5 薬物動態試験： 分布

Test article: Darolutamide

Table 5-1: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Wistar	Route:	oral	Assay:	WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 7 (1 per time point)		
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum		
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)		

	Equivalent concentration Ceq [mg-eq/kg]						
Organs/tissues	**0.25 h**	**1 h**	**6 h**	**12 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Adrenal cortex	34.6	34.9	37.6	44.0	5.66	<0.207	<0.207
Adrenal medulla	30.0	27.0	32.6	32.4	4.48	<0.207	<0.207
Aortic wall	17.8	25.5	27.6	34.3	3.68	<0.207	<0.207
Bile duct contents	53.4	90.5	56.8	70.1	59.5	<0.207	<0.207
Blood (LSC)	21.9	22.8	24.6	32.0	3.53	<0.080	<0.080
Blood (WBA)	**17.4**	**21.3**	**23.7**	**27.3**	**2.87**	**<0.207**	**<0.207**
Bone marrow	9.00	15.7	8.69	13.5	1.34	<0.207	<0.207
Bone surface	5.44	5.97	8.11	7.87	0.643	<0.207	<0.207
Brain	1.29	2.08	1.32	2.28	0.310	<0.207	<0.207
Brown fat	15.2	16.1	17.4	26.5	2.15	<0.207	<0.207
Bulbo-urethral gland	14.0	22.6	19.3	21.5	2.79	<0.207	<0.207
Caecum mucosa	12.3	11.6	16.0	27.2	20.9	0.426	<0.207
Choroid plexus	2.68	8.64	3.67	6.13	0.761	<0.207	<0.207
Epididymis	4.65	11.6	14.1	12.4	1.94	<0.207	<0.207
Epithelial tongue	12.7	18.8	14.3	21.7	3.19	<0.207	<0.207
Exorbital lachrymal gland	13.4	21.6	18.7	23.8	1.86	<0.207	<0.207
Fundic stomach mucosa	17.6	17.8	22.5	23.5	3.58	<0.207	<0.207
Harderian gland	16.8	33.6	27.5	37.4	3.16	0.281	<0.207
Intra-orbital lachrymal gland	14.0	18.3	18.4	26.0	2.20	<0.207	<0.207

Test article: Darolutamide

Table 5-1: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose (continued)

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Wistar	Route:	oral	Assay:	WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 7 (1 per time point)		
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum		
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)		

	Equivalent concentration Ceq [mg-eq/kg]						
Organs/tissues	**0.25 h**	**1 h**	**6 h**	**12 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Kidney cortex	28.6	42.7	47.6	63.2	12.8	0.287	<0.207
Kidney medulla	18.1	28.0	25.9	40.7	7.69	<0.207	<0.207
Large intestine mucosa	12.5	23.1	17.4	30.6	50.1	<0.207	<0.207
Lens of the eye	0.385	0.651	0.666	1.01	0.347	<0.207	<0.207
Liver	41.3	43.5	47.1	66.8	8.52	0.880	0.250
Lung	15.4	23.7	21.4	28.6	2.81	<0.207	<0.207
Mandibular lymph node	10.3	17.6	15.1	23.9	2.26	<0.207	<0.207
Meninges	3.89	4.59	3.17	4.39	0.362	<0.207	<0.207
Muscle	7.88	11.4	10.5	14.5	1.01	<0.207	<0.207
Myocardium	16.3	23.5	20.1	25.2	2.53	<0.207	<0.207
Nasal mucosa	2.89	8.02	7.69	10.8	2.17	0.769	<0.207
Non fundic stomach mucosa	478	9.15	91.5	54.9	20.8	0.313	<0.207
Oesophageal wall	25.9	16.4	14.2	12.7	2.92	<0.207	<0.207
Pancreas	19.5	22.7	22.5	26.2	2.44	<0.207	<0.207
Pineal body	13.0	19.9	20.3	25.5	1.72	<0.207	<0.207
Pituitary gland	13.6	20.4	20.2	26.1	1.59	<0.207	<0.207
Plasma (LSC)	34.9	35.4	39.9	48.2	5.84	0.061	<0.052
Preputial gland	14.7	30.9	25.2	26.6	3.54	1.08	<0.207
Prostate	12.4	14.8	12.2	18.4	6.51	<0.207	<0.207
Rectum mucosa	5.26	14.5	14.2	28.2	51.1	0.875	<0.207
Salivary glands	14.5	23.0	20.0	25.5	2.33	<0.207	<0.207
Seminal vesicles	2.25	5.33	4.92	8.98	2.89	<0.207	<0.207

Test article: Darolutamide

Table 5-1: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose (continued)

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Wistar	Route:	oral	Assay:	WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 7 (1 per time point)		
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum		
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)		

	Equivalent concentration Ceq [mg-eq/kg]						
Organs/tissues	**0.25 h**	**1 h**	**6 h**	**12 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Skin	4.82	14.2	11.6	15.1	1.59	0.252	<0.207
Small intestine mucosa	62.5	39.5	47.7	57.1	4.10	<0.207	<0.207
Spinal cord	1.02	2.18	1.65	2.31	0.373	<0.207	<0.207
Spleen	18.8	16.8	28.1	20.2	1.43	<0.207	<0.207
Testis	1.60	3.76	6.12	11.3	1.71	<0.207	<0.207
Thymus	7.18	19.1	16.0	25.5	1.88	<0.207	<0.207
Thyroid gland	17.8	19.7	17.8	20.4	2.65	<0.207	<0.207
Tongue	12.5	21.0	19.6	24.3	2.53	<0.207	<0.207
Tooth pulp	10.4	19.3	18.6	21.3	2.16	<0.207	<0.207
Trachea	6.35	12.7	6.19	12.3	0.931	<0.207	<0.207
Urinary bladder wall	22.0	144	262	185	541	0.574	<0.207
Urinary bladder contents	25.0	173	379	520	374	3.99	<0.207
Uveal tract / retina	9.78	18.4	9.20	12.9	1.49	<0.207	<0.207
White fat	1.22	0.912	1.72	1.79	0.610	<0.207	<0.207

< = value below lower limit of quantitation

Test article: Darolutamide

Table 5-2: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Wistar	Route:	oral	Assay: WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 7 (1 per time point)	
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum	
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)	

Organs / tissues	AUC(0-24) [mg-eq·h/kg]	AUC [mg-eq·h/kg]	Ceq_{max} [mg-eq/kg]	Ceq_{max} ratio Organ/blood	t_{max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	Regression range [h]
Adrenal cortex	681	714	44.0	1.61	12	~4.06	12.0-24.0
Adrenal medulla	538	566	32.6	1.19	6	~4.20	12.0-24.0
Aortic wall	502	521	34.3	1.26	12	~3.73	12.0-24.0
Bile duct contents	1580	6220	90.5	3.32	1	55.8	1.00-24.0
Blood (LSC)	463	482	32.0	1.17	12	~3.77	12.0-24.0
Blood (WBA)	**412**	**428**	**27.3**	**1.00**	**12**	**~3.69**	**12.0-24.0**
Bone marrow	199	206	15.7	0.575	1	~3.60	12.0-24.0
Bone surface	123	126	8.11	0.297	6	~3.32	12.0-24.0
Brain	32.4	34.3	2.28	0.0835	12	~4.17	12.0-24.0
Brown fat	345	356	26.5	0.971	12	~3.31	12.0-24.0
Bulbo-urethral gland	352	369	22.6	0.828	1	~4.07	12.0-24.0
Caecum mucosa	496	755	27.2	1.00	12	9.54	12.0-72.0
Choroid plexus	93.9	98.3	8.64	0.316	1	~3.99	12.0-24.0
Epididymis	218	231	14.1	0.516	6	~4.48	12.0-24.0
Epithelial tongue	319	339	21.7	0.795	12	~4.34	12.0-24.0
Exorbital lachrymal gland	346	355	23.8	0.872	12	~3.26	12.0-24.0
Fundic stomach mucosa	381	404	23.5	0.861	12	~4.42	12.0-24.0
Harderian gland	534	595	37.4	1.37	12	9.54	12.0-72.0
Intra-orbital Lachrymal gland	354	365	26.0	0.952	12	~3.37	12.0-24.0
Kidney cortex	967	1130	63.2	2.32	12	7.98	12.0-72.0
Kidney medulla	592	647	40.7	1.49	12	~4.99	12.0-24.0

Test article: Darolutamide

Table 5-2: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose (continued)

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Wistar	Route:	oral	Assay:	WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 7 (1 per time point)		
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum		
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)		

Organs / tissues	AUC(0-24) [mg-eq·h/kg]	AUC [mg-eq·h/kg]	Ceq_{max} [mg-eq/kg]	Ceq_{max} ratio Organ/blood	t_{max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	Regression range [h]
Large intestine mucosa	744	n.c.	50.1	1.84	24	n.c.	n.c.
Lens of the eye	16.2	20.1	1.01	0.0370	12	~7.79	12.0-24.0
Liver	945	1160	66.8	2.45	12	30.3	24.0-168
Lung	413	427	28.6	1.05	12	~3.58	12.0-24.0
Mandibular lymph node	320	332	23.9	0.875	12	~3.53	12.0-24.0
Meninges	64.9	66.6	4.59	0.168	1	~3.33	12.0-24.0
Muscle	199	203	14.5	0.531	12	~3.12	12.0-24.0
Myocardium	380	393	25.2	0.923	12	~3.62	12.0-24.0
Nasal mucosa	164	247	10.8	0.396	12	18.4	12.0-72.0
Non fundic stomach mucosa	1250	1490	478	17.5	0.25	8.04	6.00-72.0
Oesophageal wall	256	279	25.9	0.949	0.25	~5.66	12.0-24.0
Pancreas	397	410	26.2	0.960	12	~3.50	12.0-24.0
Pineal body	358	365	25.5	0.934	12	~3.08	12.0-24.0
Pituitary gland	360	367	26.1	0.956	12	~2.97	12.0-24.0
Plasma (LSC)	724	785	48.2	1.77	12	6.50	12.0-72.0
Preputial gland	451	571	30.9	1.13	1	15.3	12.0-72.0
Prostate	308	383	18.4	0.674	12	~8.01	12.0-24.0
Rectum mucosa	683	1290	51.1	1.87	24	~8.18	24.0-72.0
Salivary glands	376	388	25.5	0.934	12	~3.48	12.0-24.0

Test article: Darolutamide

Table 5-2: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose (continued)

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Wistar	Route:	oral	Assay:	WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 7 (1 per time point)		
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum		
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)		

Organs / tissues	AUC(0-24) [mg-eq·h/kg]	AUC [mg-eq·h/kg]	Ceq_{max} [mg-eq/kg]	Ceq_{max} ratio Organ/blood	t_{max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	Regression range [h]
Seminal vesicles	135	165	8.98	0.329	12	~7.34	12.0-24.0
Skin	224	263	15.1	0.553	12	11.6	12.0-72.0
Small intestine mucosa	819	838	62.5	2.29	0.25	~3.16	12.0-24.0
Spinal cord	35.5	37.9	2.31	0.0846	12	~4.56	12.0-24.0
Spleen	357	363	28.1	1.03	6	~3.14	12.0-24.0
Testes	140	151	11.3	0.414	12	~4.40	12.0-24.0
Thymus	331	340	25.5	0.934	12	~3.19	12.0-24.0
Thyroid gland	329	344	20.4	0.747	12	~4.08	12.0-24.0
Tongue	363	376	24.3	0.890	12	~3.68	12.0-24.0
Tooth pulp	327	339	21.3	0.780	12	~3.63	12.0-24.0
Trachea	162	166	12.7	0.465	1	~3.22	12.0-24.0
Urinary bladder wall	6760	10600	541	19.8	24	~4.86	24.0-72.0
Urinary bladder contents	9470	13400	520	19.0	12	8.15	12.0-72.0
Uveal tract / retina	208	216	18.4	0.674	1	~3.85	12.0-24.0
White fat	31.2	38	1.79	0.0656	12	~7.73	12.0-24.0

n.c.= not calculated
~ = rough estimate, due to regression with only 2 time points

Test article: Darolutamide

Table 5-3: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose, pigmented rat

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Lister Hooded	Route:	oral	Assay:	WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 4 (1 per time point)		
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum		
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)		

	Equivalent concentration Ceq [mg-eq/kg]			
Organs/tissues	**24 h**	**72 h**	**168 h**	**672 h**
Bile duct contents	9.16	0.974	<0.207	<0.207
Caecum mucosa	43.3	0.318	<0.207	<0.207
Fundic stomach mucosa	3.03	0.218	<0.207	<0.207
High pigmented skin	2.01	1.39	1.18	1.26
Kidney cortex	11.2	0.312	<0.207	<0.207
Large intestine mucosa	50.5	0.452	<0.207	<0.207
Lens of the eye	0.819	0.297	<0.207	<0.207
Liver	8.59	0.534	0.249	<0.207
Nasal mucosa	1.97	0.514	0.453	<0.207
Non-fundic stomach mucosa	13.6	0.228	<0.207	<0.207
Preputial gland	10.7	0.337	<0.207	<0.207
Urinary bladder wall	27.1	1.18	<0.207	<0.207
Urinary bladder contents	488	1.56	0.238	<0.207
Uveal tract / retina	14.0	1.24	0.660	<0.207

< = value below lower limit of quantitation

Test article: Darolutamide

Table 5-4: Pharmacokinetics: Organ and tissue distribution, quantitative, single dose, pigmented rat

Location: 4.2.2.3.5
Report no.: R-9747

Species / strain:	Rat / Lister Hooded	Route:	oral	Assay:	WBA Radioluminography
Admin. compound:	[^{14}C]darolutamide	Gender / no.:	male / 4 (1 per time) point		
Analyte:	Total radioactivity	Feeding condition:	ad libitum		
Dose:	100 mg/kg	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)		

Organs/tissues	AUC [µg-eq·h/g]	$t_{1/2}$ [h]	Regression points	Regression range [h]
Bile duct contents	306	~14.8	2	24.0-72.0
Caecum mucosa	943	~6.77	2	24.0-72.0
Fundic stomach mucosa	91.6	~12.6	2	24.0-72.0
Kidney cortex	285	~9.29	2	24.0-72.0
Large intestine mucosa	1120	~7.05	2	24.0-72.0
Lens of the eye	48.6	~32.8	2	24.0-72.0
Liver	286	31.2	3	24.0-168
Nasal mucosa	164	77.6	3	24.0-168
Non-fundic stomach mucosa	323	~8.14	2	24.0-72.0
Plasma	104	~8.03	2	24.0-72.0
Preputial gland	277	~9.62	2	24.0-72.0
Skin, high pigmented	560	203	3	24.0-168
Urinary bladder wall	740	~10.6	2	24.0-72.0
Urinary bladder contents	9990	14.4	3	24.0-168
Uveal tract / retina	535	36.3	3	24.0-168

~ = rough estimation, due to calculation of $t_{1/2}$ was performed with only 2 points

2.6.5.6 薬物動態試験： タンパク結合

Test article: Darolutamide

Table 6-1: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro

Location: 4.2.2.3.1
Report no.: R-9664

Test compound:	[^{14}C]darolutamide	Method:	Equilibrium dialysis
Analyte:	Total radioactivity	Assay:	LSC

Species / strain or Test system	Gender	Matrix	Concentration [ng/mL]	Mean fraction unbound (f_u) [%]	Mean fraction bound [%]
Mouse / CD-1	male	Plasma	94.6	4.72	95.3
Mouse / CD-1	male	Plasma	938	4.63	95.4
Mouse / CD-1	male	Plasma	4766	4.48	95.5
Mouse / Balb/c	male	Plasma	95.8	5.05	95.0
Mouse / Balb/c	male	Plasma	934	4.84	95.2
Mouse / Balb/c	male	Plasma	4733	4.89	95.1
Rat / Wistar	male	Plasma	93.0	5.46	94.5
Rat / Wistar	male	Plasma	942	5.52	94.5
Rat / Wistar	male	Plasma	4818	5.38	94.6
Dog / Beagle	male	Plasma	91.7	0.889	99.1
Dog / Beagle	male	Plasma	927	1.33	98.7
Dog / Beagle	male	Plasma	4492	8.35	91.6
Human / n.a.	male	Plasma	95.0	7.02	93.0
Human / n.a.	male	Plasma	979	7.03	93.0
Human / n.a.	male	Plasma	4894	7.03	93.0
HSA	n.a.		98.2	13.4	86.6
HSA	n.a.		964	13.2	86.8
HSA	n.a.		4886	13.8	86.2
AGP	n.a.		93.8	51.0	49.0
AGP	n.a.		970	50.6	49.4
AGP	n.a.		4559	57.4	42.6

AGP = alpha-1 acid glycoprotein HSA = human serum albumin n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 6-2: Pharmacokinetics: Blood to plasma concentration ratio in vitro

Location: 4.2.2.3.1
Report no.: R-9664

Test compound: [^{14}C]darolutamide
Analyte: Total radioactivity
Method: Partitioning Blood Cells
Assay: LSC

Species / strain	Gender	Mean conc. in blood (C_b) [ng/mL]	Mean conc. in plasma (C_p) [ng/mL]	Mean C_b / C_p
Mouse / Balb/c	male	18.9	33.0	0.57
Mouse / Balb/c	male	96.6	172	0.56
Mouse / Balb/c	male	995	1738	0.57
Rat / Wistar	male	18.3	27.6	0.64
Rat / Wistar	male	96.6	148	0.65
Rat / Wistar	male	1033	1534	0.67
Dog / Beagle	male	20.2	43.5	0.47
Dog / Beagle	male	87.7	179	0.49
Dog / Beagle	male	1077	2114	0.51
Human / n.a.	male	23.0	30.2	0.76
Human / n.a.	male	108	148	0.73
Human / n.a.	male	1197	1450	0.82

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 6-3: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro

Location: 4.2.2.3.2
Report no.: R-9729

Test compound:	(*S*,*R*)-darolutamide	Method:	Equilibrium dialysis
Analyte:	(*S*,*R*)-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Species / strain	Gender	Matrix	Concentration [ng/mL]	Mean fraction unbound (f_u) [%]	Mean fraction bound [%]
Rat / Wistar	male	Plasma	996	4.9	95.1
Rat / Wistar	male	Plasma	4590	5.1	94.9
Rat / Wistar	male	Plasma	9530	4.5	95.5
Dog / Beagle	male	Plasma	1200	0.3	99.7
Dog / Beagle	male	Plasma	2290	0.3	99.7
Dog / Beagle	male	Plasma	5940	0.8	99.2
Dog / Beagle	male	Plasma	11600	5.1	94.9
Dog / Beagle	male	Plasma	23100	10.2	89.8
Monkey / Cynomolgus	male	Plasma	1130	10.6	89.4
Monkey / Cynomolgus	male	Plasma	5730	11.2	88.8
Monkey / Cynomolgus	male	Plasma	11200	10.9	89.1
Human / n.a.	male	Plasma	949	7.8	92.2
Human / n.a.	male	Plasma	4460	7.7	92.3
Human / n.a.	male	Plasma	9400	8.4	91.6

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 6-4: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro

Location: 4.2.2.3.2
Report no.: R-9729

Test compound:	(*S*,*S*)-darolutamide	Method:	Equilibrium dialysis
Analyte:	(*S*,*S*)-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Species / strain	Gender	Matrix	Concentration [ng/mL]	Mean fraction unbound (f_u) [%]	Mean fraction bound [%]
Rat / Wistar	male	Plasma	975	6.4	93.6
Rat / Wistar	male	Plasma	4270	5.8	94.2
Rat / Wistar	male	Plasma	9250	5.0	95.0
Dog / Beagle	male	Plasma	1180	n.a.	n.a.
Dog / Beagle	male	Plasma	2490	0.3	99.7
Dog / Beagle	male	Plasma	6190	0.9	99.1
Dog / Beagle	male	Plasma	12100	5.8	94.2
Dog / Beagle	male	Plasma	24900	11.3	88.7
Monkey / Cynomolgus	male	Plasma	1170	10.1	89.9
Monkey / Cynomolgus	male	Plasma	6280	9.8	90.2
Monkey / Cynomolgus	male	Plasma	12600	10.4	89.6
Human / n.a.	male	Plasma	927	7.9	92.1
Human / n.a.	male	Plasma	5120	8.3	91.7
Human / n.a.	male	Plasma	9510	7.8	92.2

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 6-5: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro

Location: 4.2.2.3.3
Report no.: R-9883

Test compound:	Darolutamide		Method:	Equilibrium dialysis	
Analyte:	Darolutamide		Assay:	LC-MS/MS	
Species / strain or Test system	**Gender**	**Matrix**	**Concentration [ng/mL]**	**Mean fraction unbound (f_u) [%]**	**Mean fraction bound [%]**
Mouse / CD-1	male	Plasma	15.8	4.13	95.9
Mouse / CD-1	male	Plasma	79.7	4.47	95.5
Mouse / Balb/c	male	Plasma	16.8	4.64	95.4
Mouse / Balb/c	male	Plasma	79.7	4.68	95.3
Rat / Wistar	male	Plasma	15.2	5.61	94.4
Rat / Wistar	male	Plasma	77.5	5.53	94.5
Dog / Beagle	male	Plasma	15.8	0.888	99.1
Dog / Beagle	male	Plasma	82.8	0.710	99.3
Human / n.a.	male	Plasma	17.5	9.13	90.9
Human / n.a.	male	Plasma	87.1	9.75	90.3
HSA			18.2	15.4	84.6
HSA			90.2	15.9	84.1
AGP			16.0	71.0	29.0
AGP			77.8	56.1	43.9

AGP = alpha-1 acid glycoprotein
HSA = human serum albumin
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 6-6: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro

Location: 4.2.2.3.3
Report no.: R-9883

Test compound:	Keto-darolutamide	Method:	Equilibrium dialysis
Analyte:	Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Species / strain or Test system	Gender	Matrix	Concentration [ng/mL]	Mean fraction unbound (f_u) [%]	Mean fraction bound [%]
Mouse / CD-1	male	Plasma	154	0.852	99.1
Mouse / CD-1	male	Plasma	819	0.647	99.4
Mouse / CD-1	male	Plasma	4136	0.566	99.4
Mouse / CD-1	male	Plasma	6934	0.710	99.3
Mouse / Balb/c	male	Plasma	147	1.11	98.9
Mouse / Balb/c	male	Plasma	794	1.06	98.9
Mouse / Balb/c	male	Plasma	4082	0.781	99.2
Mouse / Balb/c	male	Plasma	4653	0.832	99.2
Rat / Wistar	male	Plasma	159	0.842	99.2
Rat / Wistar	male	Plasma	875	0.804	99.2
Rat / Wistar	male	Plasma	4154	0.651	99.3
Rat / Wistar	male	Plasma	9577	0.672	99.3
Dog / Beagle	male	Plasma	162	0.285	99.7
Dog / Beagle	male	Plasma	839	0.396	99.6
Dog / Beagle	male	Plasma	4269	2.26	97.7
Dog / Beagle	male	Plasma	8021	3.40	96.6
Human / n.a.	male	Plasma	170	0.200	99.8
Human / n.a.	male	Plasma	840	0.186	99.8
Human / n.a.	male	Plasma	3856	0.214	99.8
Human / n.a.	male	Plasma	7531	0.182	99.8

Test article: Darolutamide

Table 6-6: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro (continued)

Location: 4.2.2.3.3
Report no.: R-9883

Test compound:	Keto-darolutamide	Method:	Equilibrium dialysis
Analyte:	Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Species / strain or Test system	Gender	Matrix	Concentration [ng/mL]	Mean fraction unbound (f_u) [%]	Mean fraction bound [%]
HSA			176	0.343	99.7
HSA			835	0.352	99.6
HSA			4278	0.361	99.6
HSA			8307	0.291	99.7
AGP			148	33.9	66.1
AGP			738	39.7	60.3
AGP			3690	46.3	53.7
AGP			6878	48.7	51.3

HSA = human serum albumin
AGP = alpha-1 acid glycoprotein
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 6-7: Pharmacokinetics: Blood to plasma concentration ratio in vitro

Location: 4.2.2.3.3
Report no.: R-9883

Test compound:	Keto-darolutamide	Method:	Partitioning Blood Cells
Analyte:	Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Species / strain	Gender	Mean conc. in blood (C_b) [ng/mL]	Mean conc. in plasma (C_p) [ng/mL]	Mean C_b / C_p
Mouse / Balb/c	male	200	396	0.509
Mouse / Balb/c	male	1003	1877	0.534
Mouse / Balb/c	male	10333	17967	0.575
Rat / Wistar	male	176	336	0.525
Rat / Wistar	male	837	1697	0.494
Rat / Wistar	male	8130	15533	0.525
Dog / Beagle	male	221	447	0.496
Dog / Beagle	male	1083	2030	0.533
Dog / Beagle	male	10370	15700	0.661
Human / n.a.	male	140	274	0.511
Human / n.a.	male	729	1470	0.495
Human / n.a.	male	8307	16167	0.514

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 6-8: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro

Location: 4.2.2.3.4
Report no.: PH-39986

Test compound:	[^{14}C]darolutamide	Method:	Equilibrium dialysis	
Analyte:	Total radioactivity	Assay:	LSC	

Species / strain or Test system	**Gender**	**Matrix**	**Concentration [ng/mL]**	**Mean fraction unbound (f_u) [%]**	**Mean fraction bound [%]**
Minipig / Goettingen	male	plasma	105	3.92	96.1
Minipig / Goettingen	male	plasma	1100	4.69	95.3
Minipig / Goettingen	male	plasma	4969	8.86	91.1
Monkey / Cynomolgus	male	plasma	109 – 5123	11.5	88.5
FCS (10%) in Williams medium			108 – 5231	67.4	32.6
HLM 0.05 mg/mL			418 – 7251	97.6	2.4
HLM 0.1 mg/mL			427 – 7443	95.6	4.4
HLM 0.5 mg/mL			407 – 7935	83.1	16.9

FCS = fetal calf serum
HLM= human liver microsomes

Test article: Darolutamide

Table 6-9: Pharmacokinetics: Plasma protein binding in vitro

Location: 4.2.2.3.4
Report no.: PH-39986

Test compound:	[^{14}C]keto-darolutamide		Method:	Equilibrium dialysis	
Analyte:	Total radioactivity		Assay:	LSC	
Species / strain or Test system	**Gender**	**Matrix**	**Concentration [ng/mL]**	**Mean fraction unbound (f_u) [%]**	**Mean fraction bound [%]**
Minipig / Goettingen	male	plasma	101 – 4759	1.09	98.9
Monkey / Cynomolgus	male	plasma	102 – 4492	0.275	99.7
FCS (10%) in Williams medium			111 – 4438	51.2	48.8
HLM 0.05 mg/mL			387 – 6498	97.9	2.1
HLM 0.1 mg/mL			380 – 7061	95.3	4.7
HLM 0.5 mg/mL			390 – 7713	80.9	19.1

FCS = fetal calf serum
HLM= human liver microsomes

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

妊娠動物における試験は実施していない。

2.6.5.7 薬物動態試験： 妊娠または授乳動物における試験（乳汁排泄）

乳汁排泄に関する試験は実施していない。

2.6.5.8 薬物動態試験： その他の分布試験

その他の分布試験は実施していない。

2.6.5.9 薬物動態試験： In Vivo における代謝

Test article: Darolutamide

Table 9-1: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Rat

Location: 4.2.2.4.16
Report no.: R-9727

Species / strain:	Rat / Wistar	Dose:	11.1 mg/kg (oral)[a]		Gender / no.:	male / 4	Assay:	LSC		
Compound:	[^{14}C]darolutamide		6.38 mg/kg (intravenous)[b]							
Analyte:	Radioactivity	Matrix:	Urine		Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril				
Time period [h]					**0-96**					
Administration route			**oral**					**intravenous**		
Animal No.	**001**	**002**	**003**	**004**	**Mean**	**005**	**006**	**007**	**008**	**Mean**
Excretion (% of dose)	**26.2**	**34.7**	**31.9**	**28.5**	**30.3**	**30.9**	**31.3**	**35.5**	**32.0**	**32.4**
Identification (% of dose)										
M-2	13.1	18.8	16.2	15.9	16.0	15.9	17.3	19.4	17.2	17.5
M-4	5.4	7.7	6.1	6.2	6.3	6.2	5.8	7.1	6.1	6.3
M-6, M-7, M-8	3.5	4.4	4.3	3.2	3.9	3.9	2.3	3.3	3.6	3.3
Darolutamide	2.7	1.7	2.1	2.3	2.2	3.5	2.5	3.2	2.5	2.9
M-1						0.2	0.7	0.9	0.4	0.5
Others	1.4	2.0	3.0	0.9	1.8	1.3	2.6	1.4	2.1	1.9
Sum	**26.1**	**34.7**	**31.8**	**28.5**	**30.3**	**31.0**	**31.1**	**35.3**	**31.9**	**32.4**

a = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 1
b = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 2

Test article: Darolutamide

Table 9-2: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Rat

Location: 4.2.2.4.16
Report no.: R-9727

Species / strain:	Rat / Wistar	Dose:	11.1 mg/kg (oral)[a]		Gender / no.:	male / 4	Assay:	LSC		
Compound:	[^{14}C]darolutamide		6.38 mg/kg (intravenous)[b]							
Analyte:	Radioactivity	Matrix:	Feces		Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril				
Time period [h]					**0-48**					
Administration route			**oral**					**intravenous**		
Animal No.	**001**	**002**	**003**	**004**	**Mean**	**005**	**006**	**007**	**008**	**Mean**
Excretion (% of dose)	**65.3**	**60.5**	**60.4**	**65.1**	**62.8**	**62.6**	**62.4**	**56.1**	**56.3**	**59.4**
Identification (% of dose)										
M-6	14.1	11.7	13.2	10.3	12.3	10.2	5.9	6.3	13.6	9.1
Darolutamide	41.5	40.3	38.7	45.1	41.4	44.6	47.3	41.6	36.2	42.4
M-1	9.8	8.5	8.3	9.6	9.0	8.1	9.0	7.4	6.4	7.7
Sum	**65.4**	**60.5**	**60.2**	**64.9**	**62.7**	**62.9**	**62.2**	**55.9**	**56.2**	**59.3**

a = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 1
b = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 2

Test article: Darolutamide

Table 9-3: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Rat

Location: 4.2.2.4.16
Report no.: R-9727

Species / strain:	Rat / Wistar	Route:	Oral	Gender / no.:	male / 16 (2 / time point)	Assay:	LSC
Compound:	[^{14}C]darolutamide	Dose:	10.85 mg/kg[a]				
Analyte:	Radioactivity	Matrix:	Plasma	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril		

Time [h]		**M-6,M-7,M-8 (ng-eq/mL)**	**Darolutamide (ng-eq/mL)**	**Keto-darolutamide (ng-eq/mL)**	**Sum of [^{14}C]-Analytes (ng-eq/mL)**	**Sum of Bioanalytics (ng/mL)**	**Total radioactivity (ng-eq/mL)**
0.25		<	1620	972	2590	2290	2590
1		228	7450	6600	14300	9330	14300
2		346	4730	6080	11100	7560	11100
3		185	4380	4230	8790	6320	8790
6		<	1900	2180	4080	3060	4080
12		<	458	279	737	513	737
Parameter	**Unit**						
AUC(0-t_{last})	[ng·h/mL]	658	29100	29200	59300	42000	59300
t_{last}	[h]	3.00	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
C_{max}	[ng/mL]	346	7450	6600	14300	9330	14300
t_{max}	[h]	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$t_{1/2}$	[h]	1.11	2.88	2.27	2.54	2.54	2.54

a = mean calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 3
< = values below LLOQ

Test article: Darolutamide

Table 9-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Rat

Location: 4.2.2.4.17
Report no.: PH-39959

Species / strain:	Rat BDC / Wistar	Route:	Intravenous bolus	Gender / no.:	male / 5	Assay:	LSC, LC-MS/MS
Compound:	[^{14}C]darolutamide	Dose:	2 mg/kg				
Analyte:	Radioactivity	Matrix:	Urine, feces, bile, GIT	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril		

Collection interval [h]			**0-24**	
Samples analyzed	**Urine**	**Feces**	**Bile**	**GIT**
%$A_E(t_1\text{-}t_2)$ [% of dose]	**23.4**	**12.8**	**52.5**	**7.06**
%$A_{E,ur+fec+bile+GIT}(t_1\text{-}t_2)$ [% of dose]		**95.8**		

Identification	**[% of dose]**			
Darolutamide	0.782	12.6	7.83	6.72
M-1	0.109	0.171	0.133	0.111
M-5	0.181	-	-	-
M-6	0.313	-	0.924	-
M-7	-	-	6.43	-
M-10	-	-	11.2	-
M-15	-	-	2.35	-
M-22	-	-	3.35	-
M-24	16.1	-	4.16	-
M-28	0.333	-	9.55	-
M-29	4.27	-	2.69	-
M-37	-	-	1.39	-
M-39	0.355	-	-	-
M-40	0.231	-	-	-
Other	0.793	-	2.45	0.232
Calculated	23.4	12.8	52.5	7.06
Calculated total		**95.8**		

Test article: Darolutamide

Table 9-5: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Rat

Location: 4.2.2.4.17
Report no.: PH-39959

Species / strain:	Rat BDC / Wistar	Route:	Oral	Gender / no.:	male / 5	Assay:	LSC, LC-MS/MS
Compound:	[^{14}C]darolutamide	Dose:	2 mg/kg				
Analyte:	Radioactivity	Matrix:	Urine, feces, bile, GIT	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril		

Collection interval [h]		**0-24**	
Samples analyzed	**Urine**	**Feces**	**Bile**	**GIT**
%$A_E(t_1\text{-}t_2)$ [% of dose]	**16.7**	**6.46**	**44.0**	**23.7**
%$A_{E,ur+fec+bile+GIT}(t_1\text{-}t_2)$ [% of dose]		**90.8**		
Identification		**[% of dose]**		
Darolutamide	0.293	6.26	8.68	23.2
M-1	-	0.202	0.135	0.510
M-5	0.0953	-	-	-
M-6	0.122	-	-	-
M-7	-	-	5.93	-
M-10	-	-	10.7	-
M-15	-	-	2.79	-
M-22	-	-	3.81	-
M-24	11.3	-	3.72	-
M-28	0.298	-	4.20	-
M-29	2.87	-	1.24	-
M-37	-	-	0.643	-
M-39	0.268	-	-	-
M-40	0.127	-	-	-
Other	1.32	-	2.17	-
Calculated	16.7	6.46	44.0	23.7
Calculated total		**90.8**		

Test article: Darolutamide

Table 9-6: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Rat

Location: 4.2.2.4.17
Report no.: PH-39959

Species / strain:	Rat BDC / Wistar	Route:	Intravenous, oral	Gender / no.:	male / 5	Assay:	LSC, LC-MS/MS	
Compound:	[^{14}C]darolutamide	Dose:	2 mg/kg					
Analyte:	Radioactivity	Matrix:	Urine, feces, bile, GIT	Formulation:	50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril			

Route of administration			**IV**				**PO**	
Collection interval [h]			**0-24**				**0-24**	
Excretion route	**Renal**	**Hepato-Biliary**	**Extra-Biliary**	**total**	**Renal**	**Hepato-Biliary**	**Extra-Biliary**	**total**
%$A_E(t_1-t_2)$ [% of dose]	**23.4**	**52.5**	**19.9**	**95.8**	**16.7**	**44.0**	**30.2**	**90.8**
Metabolic pathway (individual metabolites)				**[% of dose]**				
Oxidation (M-1, M-5, M-6, M-10, M-22, M-24, M-28, M-29, M-37, M-39, M-40)	21.8	34.3	0.282	56.5	15.0	25.3	0.712	41.1
Glucuronidation (M-7, M-15)	-	8.78	-	8.78	-	8.72	-	8.72
Parent drug (Darolutamide)	0.782	7.83	19.3	28.0	0.293	8.68	29.4	38.4
Not assigned	0.789	1.58	0.229	2.60	1.32	1.25	0.00280	2.57
Total per route	23.4	52.5	19.9		16.7	44.0	30.2	
Calculated total			**95.8**				**90.8**	

Test article: Darolutamide

Table 9-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Human

Location: 4.2.2.4.18
Report no.: PH-40075

Species / strain: Human / Caucasian, black | Route: oral | Gender / no.: male / 6
Compound: [^{14}C]darolutamide | Dose: 300 mg per subject
Matrix: Plasma | Assay: HPLC-LSC

Time [h]	Subject 201			Subject 202		
	Total radioactivity [ng-eq/mL]	Darolutamide [ng-eq/mL]	M-1 [ng-eq/mL]	Total radioactivity [ng-eq/mL]	Darolutamide [ng-eq/mL]	M-1 [ng-eq/mL]
0.25	2130	943	1190	1690	754	936
0.5	3740	1740	2010	5910	2140	3770
1	7040	2490	4490	14600	5330	8910
1.5	14800	4850	9590	14600	3770	10200
2	15200	4350	10900	12400	3850	7970
3	11400	3370	7730	10300	3850	6330
4	10300	3070	6840	8690	2450	5740
5	8840	2360	6180	8440	3710	4500
6	8120	2050	5870	7550	2540	4800
8	7240	1790	5180	6300	1630	4320
12	4970	1530	3440	4330	1240	2880
16	4260	1270	2990	3000	882	2120
24	2190	664	1460	1560	444	1120
48	370	176	194	384	200	184

Test article: Darolutamide

Table 9-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Human (continued)

Location: 4.2.2.4.18
Report no.: PH-40075

Species / strain: Human / Caucasian, black | Route: oral | Gender / no.: male / 6
Compound: [^{14}C]darolutamide | Dose: 300 mg per subject
Matrix: Plasma | Assay: HPLC-LSC

		Subject 201			Subject 202		
		Total radioactivity	**Darolutamide**	**M-1**	**Total radioactivity**	**Darolutamide**	**M-1**
AUC	[µg·h/L]	171000	52800	115000	149000	49400	96600
AUC	[%]	100	30.9	67.3	100	33.2	64.8
AUC_{norm}	[kg·h/L]	0.570	0.176	0.384	0.498	0.165	0.322
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[µg·h/L]	166000	49900	113000	145000	46100	94200
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	0.554	0.166	0.376	0.483	0.154	0.314
t_{last}	[h]	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0
$\%AUC(0\text{-}t_1)$	[%]	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
$\%AUC(t_{last\text{-}inf})$	[%]	3.0	5.5	2.2	3.2	6.9	2.5
C_{max}	[µg/L]	15200	4850	10900	14600	5330	10200
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.0507	0.0162	0.0362	0.0488	0.0178	0.0340
t_{max}	[h]	2.00	1.50	2.00	1.50	1.00	1.50
$t_{1/2}$	[h]	9.41	11.6	8.58	9.64	13.4	9.02
Regression range	[h]	5.00-48.0	5.00-48.0	5.00-48.0	5.00-48.0	8.00-48.0	5.00-48.0

Test article: Darolutamide

Table 9-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Human (continued)

Location: 4.2.2.4.18
Report no.: PH-40075

Species / strain: Human / Caucasian, black | Route: oral | Gender / no.: male / 6
Compound: [^{14}C]darolutamide | Dose: 300 mg per subject
Matrix: Plasma | Assay: HPLC-LSC

	Subject 203			Subject 204		
Time [h]	Total radioactivity [ng-eq/mL]	Darolutamide [ng-eq/mL]	M-1 [ng-eq/mL]	Total radioactivity [ng-eq/mL]	Darolutamide [ng-eq/mL]	M-1 [ng-eq/mL]
0.25	1760	777	945	2990	752	1700
0.5	4650	1280	2850	5770	939	4210
1	12700	3190	7920	13700	3260	10500
1.5	18500	5500	13000	12300	2270	8660
2	15500	3990	8800	11100	3690	7450
3	11900	3960	7650	8550	3160	5390
4	9740	2800	5270	7750	2340	5290
5	7070	2570	4410	6230	2150	4080
6	7620	2230	5140	6100	1150	4160
8	6600	1100	3800	5070	1240	3400
12	4190	1530	2410	3410	1110	2160
16	2720	738	1730	2050	468	1380
24	2090	382	1350	1090	521	571
48	241	-	-	219	-	-

Test article: Darolutamide

Table 9-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Human (continued)

Location: 4.2.2.4.18
Report no.: PH-40075

Species / strain: Human / Caucasian, black Route: oral Gender / no.: male / 6
Compound: [^{14}C]darolutamide Dose: 300 mg per subject
Matrix: Plasma Assay: HPLC-LSC

		Subject 203			Subject 204		
		Total radioactivity	**Darolutamide**	**M-1**	**Total radioactivity**	**Darolutamide**	**M-1**
AUC	[µg·h/L]	153000	40800	108000	116000	36300	72100
AUC	[%]	100	26.7	70.6	100	31.3	62.2
AUC_{norm}	[kg·h/L]	0.512	0.136	0.360	0.387	0.121	0.240
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[µg·h/L]	150000	35500	79600	114000	28200	66700
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	0.501	0.118	0.265	0.378	0.0941	0.222
t_{last}	[h]	48.0	24.0	24.0	48.0	24.0	24.0
$\%AUC(0\text{-}t_1)$	[%]	0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	0.3
$\%AUC(t_{last\text{-}inf})$	[%]	2.1	13.0	26.2	2.1	22.3	7.6
C_{max}	[µg/L]	18500	5500	13000	13700	3690	10500
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.0618	0.0183	0.0434	0.0457	0.0123	0.0349
t_{max}	[h]	1.50	1.50	1.50	1.00	2.00	1.00
$t_{1/2}$	[h]	8.72	8.91	15.0	8.73	12.4	6.47
Regression range	[h]	5.00-48.0	8.00-24.0	12.0-24.0	5.00-48.0	6.00-24.0	5.00-24.0

Test article: Darolutamide

Table 9-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Human (continued)

Location: 4.2.2.4.18
Report no.: PH-40075

Species / strain: Human / Caucasian, black | Route: oral | Gender / no.: male / 6
Compound: [^{14}C]darolutamide | Dose: 300 mg per subject
Matrix: Plasma | Assay: HPLC-LSC

	Subject 205			Subject 206		
Time [h]	Total radioactivity [ng-eq/mL]	Darolutamide [ng-eq/mL]	M-1 [ng-eq/mL]	Total radioactivity [ng-eq/mL]	Darolutamide [ng-eq/mL]	M-1 [ng-eq/mL]
0.25	2750	1010	1740	6780	2140	4580
0.5	11700	2510	8910	10600	3470	5960
1	16000	2820	12300	17900	6810	11100
1.5	12800	2700	9570	22200	3520	15400
2	10400	1990	7730	20200	4450	14600
3	10100	3200	6650	15100	3940	8690
4	8370	2230	5590	12800	4210	7870
5	7710	2090	4760	11400	2620	8400
6	6500	1860	4530	9170	3630	4630
8	5290	1490	3550	8220	2540	4800
12	3110	948	2160	5600	2270	2910
16	2030	374	1330	4230	1200	2730
24	1290	285	522	2200	768	1440
48	336	-	-	423	-	423

Test article: Darolutamide

Table 9-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Human (continued)

Location: 4.2.2.4.18
Report no.: PH-40075

Species / strain: Human / Caucasian, black | Route: oral | Gender / no.: male / 6
Compound: [^{14}C]darolutamide | Dose: 300 mg per subject
Matrix: Plasma | Assay: HPLC-LSC

		Subject 205			Subject 206		
		Total radioactivity	**Darolutamide**	**M-1**	**Total radioactivity**	**Darolutamide**	**M-1**
AUC	[µg·h/L]	129000	29100	77100	205000	61400	133000
AUC	[%]	100	22.6	59.8	100	30.0	64.9
AUC_{norm}	[kg·h/L]	0.429	0.0970	0.257	0.683	0.205	0.444
$AUC(0\text{-}t_{last})$	[µg·h/L]	125000	27100	72700	199000	52900	126000
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	[kg·h/L]	0.416	0.0902	0.242	0.665	0.176	0.421
t_{last}	[h]	48.0	24.0	24.0	48.0	24.0	48.0
$\%AUC(0\text{-}t_1)$	[%]	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4
$\%AUC(t_{last\text{-}inf})$	[%]	3.1	7.0	5.7	2.6	13.8	5.2
C_{max}	[µg/L]	16000	3200	12300	22200	6810	15400
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.0534	0.0107	0.0411	0.0740	0.0227	0.0513
t_{max}	[h]	1.00	3.00	1.00	1.50	1.00	1.50
$t_{1/2}$	[h]	9.73	6.11	5.85	9.23	8.13	11.9
Regression range	[h]	5.00-48.0	4.00-24.0	5.00-24.0	5.00-48.0	6.00-24.0	8.00-48.0

Test article: Darolutamide

Table 9-8: Pharmacokinetics: Metabolism in vivo, Human

Location: 4.2.2.4.18
Report no.: PH-40075

Species / strain:	Human / Caucasian, black	Route:	oral	Gender / no.: male / 6
Compound:	[^{14}C]darolutamide	Dose:	300 mg per subject	
Matrix:	Urine, feces	Assay:	HPLC-LSC	

Subject	**201**		**202**		**203**		**204**		**205**		**206**		**Arithmetic mean 201 - 206**	
Sample	**Urine**	**Feces**	**Urine**	**Feces**	**Urine**	**Feces**	**Urine**	**Feces**	**Urine**	**Feces**	**Urine**	**Feces**	**Urine**	**Feces**
Time period [h]	**0-168**		**0-168**		**0-168**		**0-168**		**0-168**		**0-168**		**0-168**	
%A_E [% of dose]	**59.49**	**35.90**	**63.74**	**28.81**	**63.10**	**34.96**	**61.48**	**33.85**	**68.91**	**29.01**	**63.94**	**32.08**	**63.43**	**32.44**
%$A_{E,ur+fec}(0\text{-}t_{last})$ [% of dose]	**95.39**		**92.55**		**98.06**		**95.33**		**97.92**		**96.02**		**95.88**	
Identification							**% of dose**							
Darolutamide	7.50	34.9	8.82	27.7	4.89	33.9	5.56	30.6	6.94	26.7	6.36	28.1	6.68	30.3
M-1	-	0.349	-	0.563	-	0.118	-	1.41	-	0.334	-	0.625	-	0.566
M-2	0.745	-	1.37	-	0.997	-	1.38	-	1.51	-	1.48	-	1.26	-
M-7	25.0	-	25.3	-	29.1	-	24.9	-	26.8	-	22.0	-	25.5	-
M-10	0.759	-	0.454	-	0.689	-	0.788	-	0.710	-	0.447	-	0.640	-
M-15	6.75	-	7.28	-	7.99	-	1.01	-	6.26	-	5.20	-	5.75	-
M-21	2.41	-	3.69	-	2.89	-	2.83	-	3.71	-	3.79	-	3.22	-
M-22	3.39	-	3.61	-	4.15	-	3.45	-	4.17	-	4.10	-	3.81	-
M-24	3.81	-	3.49	-	3.40	-	5.37	-	4.56	-	4.70	-	4.21	-
M-28	2.39	0.394	1.85	0.451	1.88	-	1.88	0.710	3.12	1.85	2.92	2.36	2.38	0.961
M-29	3.61	-	5.09	-	4.15	-	9.85	-	6.43	-	7.88	-	6.17	-
Other	3.14	0.124	2.71	0.0588	2.71	0.946	4.35	1.10	4.64	0.0401	5.02	0.845	3.76	0.519
Not balanced	0.0303	0.123	0.0620	-	0.277	-	0.0780	-	0.0241	0.0859	0.0425	0.127	0.0333	0.0548
Calculated	59.5	35.9	63.7	28.8	63.1	35.0	61.5	33.9	68.9	29.0	63.9	32.1	63.4	32.4
Calculated total	**95.4**		**92.6**		**98.1**		**95.3**		**97.9**		**96.0**		**95.9**	

2.6.5.10 薬物動態試験： In Vitro 代謝

Test article: Darolutamide

Table 10-1: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Stability in Hepatocytes of different species

Location: 4.2.2.4.1
Report no.: R-11056

Species / strain:	Various	Study type:	in vitro
Material:	hepatocytes	Assay:	LC-MS/MS
Incubation time:	30 min		
Compound:	Darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide, Keto-darolutamide		

Species	**Human**		**Balb/c mouse**		**Cynomolgus monkey**		**Goettingen minipig**		**Beagle dog**	
Experiment	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**
Starting material					**Darolutamide**					
Initial amounts[a] [ng/mL]	1250	978	1170	1160	934	1160	1060	1160	876	1030
	1280	1020	1210	1190	964	1160	1050	1180	898	1030
Analyte remaining					[ng/mL]					
(*S,R*)-darolutamide	967	984	1020	877	880	847	1030	1080	991	997
(*S,S*)-darolutamide	978	1020	646	717	767	742	969	1090	423	429
keto-darolutamide	93.4	99.2	295	145	536	488	103	103	504	523
Starting material					**(*S,R*)-darolutamide**					
Initial amount [ng/mL]	2150	1720	1310	1270	1840	1660	1880	2050	1270	1690
Analyte remaining					[ng/mL]					
(*S,R*)-darolutamide	1510	1990	901	1070	1280	1320	1930	1840	1580	1170
(*S,S*)-darolutamide	73.0	87.1	n.d.	1.17	40.2	45.2	2.97	3.12	2.79	n.d.
keto-darolutamide	26.7	33.7	7.88	10.1	266	292	18.4	17.5	49.6	51.2

Test article: Darolutamide

Table 10-1: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Stability in Hepatocytes of different species (continued)

Location: 4.2.2.4.1
Report no.: R-11056

Species / strain:	Various	Study type:	in vitro
Material:	hepatocytes	Assay:	LC-MS/MS
Incubation time:	30 min		
Compound:	Darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide, keto-darolutamide		

Species	**Human**		**Balb/c mouse**		**Cynomolgus monkey**		**Goettingen minipig**		**Beagle dog**	
Experiment	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**	**A**	**B**
Starting material					**(*S*,*S*)-darolutamide**					
Initial amount [ng/mL]	1610	2070	2140	2020	2200	2430	2320	2340	1950	2440
Analyte remaining					[ng/mL]					
(*S,R*)-darolutamide	12.8	11.5	17.1	11.8	10.6	9.36	10.9	12.4	7.85	8.67
(*S,S*)-darolutamide	1680	1590	1550	1090	1450	1380	2130	2290	665	798
keto-darolutamide	155	141	341	219	676	621	189	186	1000	990
Starting material					**keto-darolutamide**					
Initial amount [ng/mL]	1210	1430	986	1210[b]	2070	1830	1830	1870	1520	1270
Analyte remaining					[ng/mL]					
(*S,R*)-darolutamide	42.1	39.7	30.8	104[b]	17.9	19.4	94.3	98.9	5.70	5.46
(*S,S*)-darolutamide	1290	1140	50.5	216[b]	388	414	126	135	70.0	74.5
keto-darolutamide	220	207	654	2170[b]	1210	1390	1590	1710	1070	1120

a = amounts of analytes in each experiment are listed in the following order; first values for (*S,R*)- and underneath (*S,S*)-darolutamide
b = data set considered partially implausible, entire experiment was excluded from further evaluation
A = data taken from experiment with the suffix -1 (report R-11021, Table 7)
B = data taken from experiment with the suffix -2 (report R-11021, Table 7)
n.d. = not detectable

Test article: Darolutamide

Table 10-2: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Metabolic stability

Location: 4.2.2.4.2
Report no.: R-9988

Species / strain:	Rat /Wistar; Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Hepatocytes, plated HepaRG cells	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	Darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide, keto-darolutamide		

	Rat hepatocytes	**Human hepatocytes**	**HepaRG**
Conversion of (*S*,*R*)-darolutamide to (*S*,*S*)-darolutamide [a]	Trace	Up to 60%	Up to 15%
Conversion of (*S*,*S*)-darolutamide to (*S*,*R*)-darolutamide [a]	Up to 7%	Up to 15%	No
Peak keto-darolutamide after (*S*,*R*)-darolutamide [a]	<5%	20%	<5%
Peak keto-darolutamide after (*S*,*S*)-darolutamide [a]	33%	30%	8%
(*S*,*R*)-darolutamide + (*S*,*S*)-darolutamide + Keto-darolutamide at 24 h (darolutamide incubation)[b]	45% / 75%	73% / 85%	47% / 76%
Darolutamide in vitro $t_{1/2}$[c]	7.6 h / 7.9 h	14 h / 14 h	14 h / 37 h
(*S*,*R*)-darolutamide in vitro $t_{1/2}$[c]	35 h / 62 h	7.0 h / 11 h	49 h / 65 h
(*S*,*S*)-darolutamide in vitro $t_{1/2}$[c]	3.4 h / 4.4 h	10 h / 8.7 h	9 h / 14 h

a = Percentages of the initial applied amount in incubations with single pure diastereomer
b = Total measured drug related material at 24 h in incubations with 2 µM / 10 µM darolutamide
c = Calculated in vitro half-life from disappearance graph using initial disappearance rate (0-6 h to 0-48 h, depending on the compound and test system). Half-life for each compound was calculated from their own incubations at 2 µM / 10 µM concentration
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-3: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Metabolism in Hepatocytes of different species

Location: 4.2.2.4.3
Report no.: R-9989

Species / strain:	various	Study type:	in vitro
Material:	Hepatocytes	Assay:	HPLC-radiodetection, LC-MS/MS
Compound:	[^{14}C]darolutamide		

	Integrated peak areas as fraction (%) of total integrated peak area					
Name	**w/o cells**	**Rat / Wistar**	**Mouse / CD-1**	**Mouse / Balb/C**	**Dog / Beagle**	**Human**
not identified	0.1	6.4	5.9	11.1	3.2	0.4
M-2, M-3 (Darolutamide + Hydroxylation + Glucuronidation)	0.4	7.2	5.6	12.5	5.1	0.7
M-4 (Keto-darolutamide + Hydroxylation + Glucuronidation)	0.8	10.1	10.3	20.0	7.7	2.2
M-5, M-6, M-7 (Darolutamide + Hydroxylation; Darolutamide + Glucuronidation)	0.7	5.3	10.8	29.6	4.6	3.7
M-8 (Keto-darolutamide + Hydroxylation)	0.1	4.1	2.2	5.1	2.7	0.7
Darolutamide	95.6	39.4	33.2	17.4	33.1	70.7
Keto-darolutamide	2.4	27.4	32.1	4.2	43.6	21.5

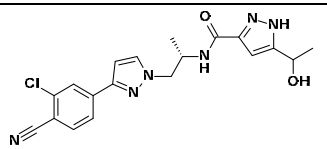
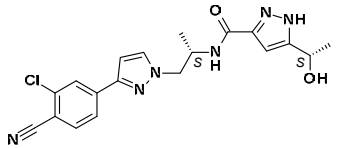
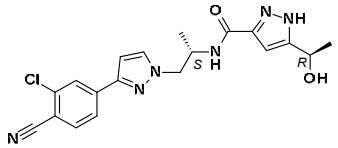
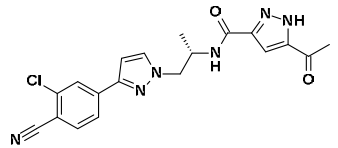
Analysed samples were 180 min time point from 5 µM incubation.
w/o cells = without cells

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

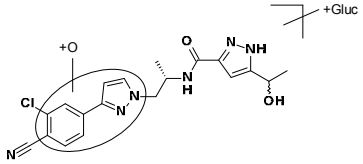
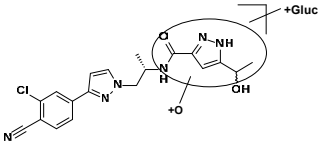
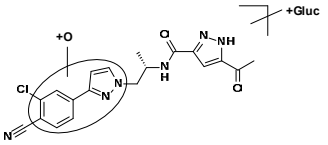
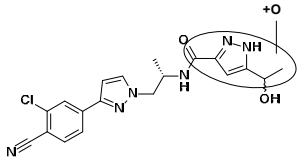
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
Darolutamide	399.1331	397.1185	-	$C_{19}H_{19}N_6O_2Cl$	
(*S*,*S*)-darolutamide	399.1331	397.1185	-	$C_{19}H_{19}N_6O_2Cl$	
(*S*,*R*)-darolutamide	399.1331	397.1185	-	$C_{19}H_{19}N_6O_2Cl$	
Keto-darolutamide	397.1180	395.1023	-2	$C_{19}H_{17}N_6O_2Cl$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

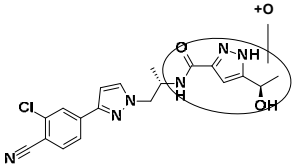
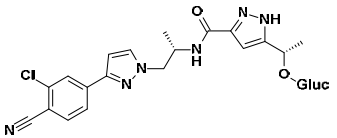
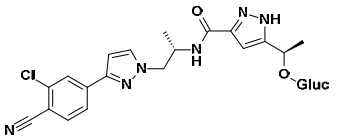
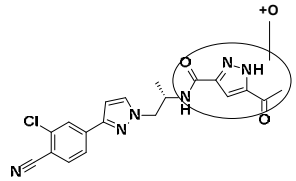
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-2	591.1606	589.1450	+192	$C_{25}H_{27}N_6O_9Cl$	
M-3	591.1606	589.1450	+192	$C_{25}H_{27}N_6O_9Cl$	
M-4	589.1450	587.1293	+190	$C_{25}H_{25}N_6O_9Cl$	
M-5	415.1285	413.1129	+16	$C_{19}H_{19}N_6O_3Cl$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

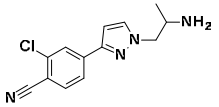
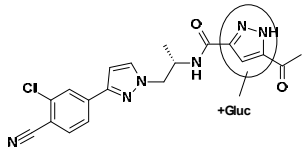
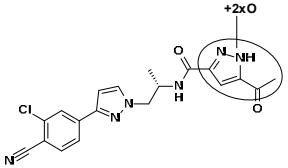
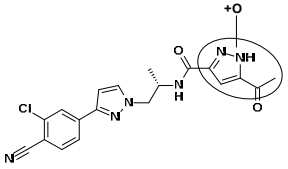
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-6	415.1285	413.1129	+16	$C_{19}H_{19}N_6O_3Cl$	
M-7a ((*S*,*S*)-M-7, BAY2415986)	575.1657	573.1501	+176	$C_{25}H_{27}N_6O_8Cl$	
M-7b ((*S*,*R*)-M-7)	575.1657	573.1501	+176	$C_{25}H_{27}N_6O_8Cl$	
M-8	413.1129	411.0972	+14	$C_{19}H_{17}N_6O_3Cl$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

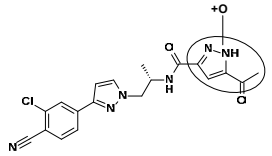
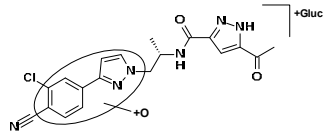
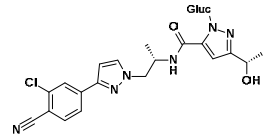
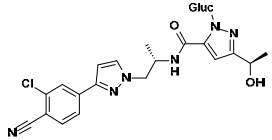
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-9	261.0907	n.d.	-136	$C_{13}H_{13}N_4Cl$	
M-10	573.1501	571.1344	+174	$C_{25}H_{25}N_6O_8Cl$	
M-11	429.1078	427.0927	+32	$C_{19}H_{17}N_6O_4Cl$	
M-12	413.1129	411.0972	+14	$C_{19}H_{17}N_6O_3Cl$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

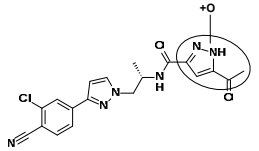
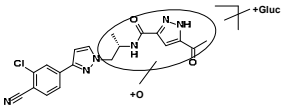
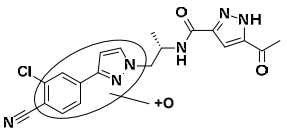
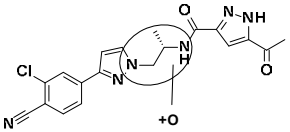
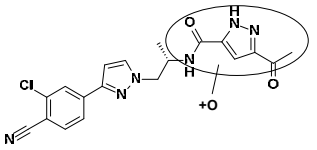
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-13	413.1129	411.0972	+14	$C_{19}H_{17}N_6O_3Cl$	
M-14	589.1450	587.1293	+190	$C_{25}H_{25}N_6O_9Cl$	
M-15a ((*S*,*S*)-M-15 (BAY 2415987)	575.1652	573.1501	+176	$C_{25}H_{27}N_6O_8Cl$	
M-15b ((*S*,*R*)-M-15)	575.1652	573.1501	+176	$C_{25}H_{27}N_6O_8Cl$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

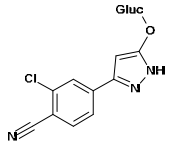
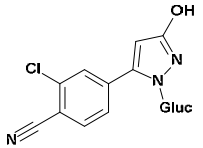
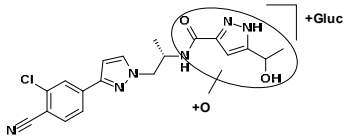
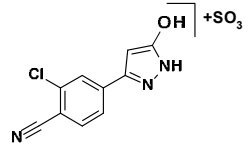
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-16	413.1129	411.0972	+14	$C_{19}H_{17}N_6O_3Cl$	
M-17	589.1450	587.1293	+190	$C_{25}H_{25}N_6O_9Cl$	
M-18	413.1129	411.0972	+14	$C_{19}H_{17}N_6O_3Cl$	
M-19	413.1129	411.0972	+14	$C_{19}H_{17}N_6O_3Cl$	
M-20	413.1129	411.0972	+14	$C_{19}H_{17}N_6O_3Cl$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

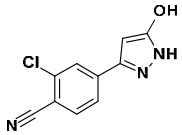
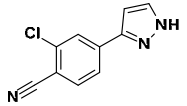
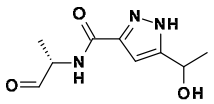
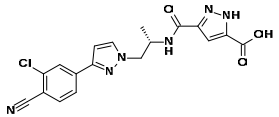
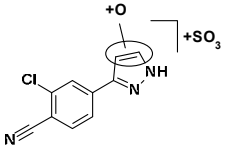
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-21 (BAY 2471019)	396.0599	394.0442	-3	$C_{16}H_{14}N_3O_7Cl$	
M-22 (BAY 2471018)	396.0599	394.0442	-3	$C_{16}H_{14}N_3O_7Cl$	
M-23	591.1606	589.1450	+192	$C_{25}H_{27}N_6O_9Cl$	
M-24	299.9846	297.9689	-99	$C_{10}H_6N_3O_4ClS$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

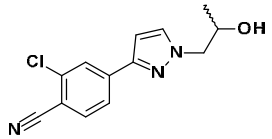
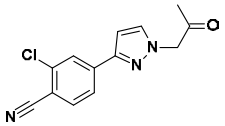
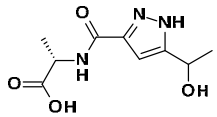
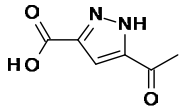
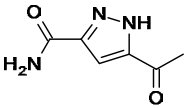
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-25	220.0278	218.0121	-179	$C_{10}H_6N_3OCl$	
M-26	204.0329	202.0172	-195	$C_{10}H_6N_3Cl$	
M-27	212.1035	210.0879	-187	$C_9H_{13}N_3O_3$	
M-28	399.0972	397.0816	0	$C_{18}H_{15}N_6O_3Cl$	
M-29	299.9846	297.9689	-99	$C_{10}H_6N_3O_4ClS$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

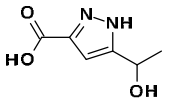
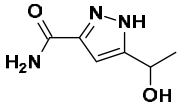
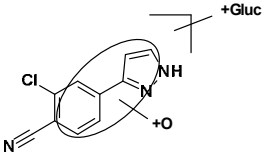
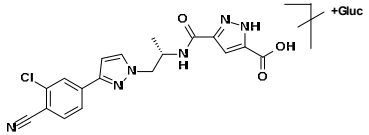
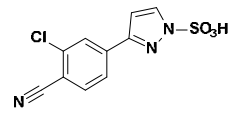
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-30	262.0747	n.d.	-137	$C_{13}H_{13}N_3OCl$	
M-31	260.0591	258.0434	-139	$C_{13}H_{11}N_3OCl$	
M-32	228.0984	226.0828	-171	$C_9H_{13}N_3O_4$	
M-33	155.0457	153.0306	-244	$C_6H_6N_2O_3$	
M-34	154.0617	152.0465	-245	$C_6H_7N_3O_2$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

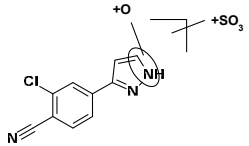
Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-35	157.0608	155.0462	-242	$C_6H_8N_2O_3$	
M-36 (BAY 2432226)	156.0768	154.0622	-243	$C_6H_9N_3O_2$	
M-37	396.0599	394.0442	-3	$C_{16}H_{14}N_3O_7Cl$	
M-38	575.1288	573.1142	+176	$C_{24}H_{24}ClN_6O_9$	
M-39	283.9891	281.9746	-116	$C_{10}H_6N_3O_3ClS$	

Test article: Darolutamide

Table 10-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Structure elucidation (continued)

Location: 4.2.2.4.4
Report no.: PH-39883

Species / strain: various Study type: in vitro
Material: hepatocytes, human liver microsomes, recombinant CYP enzymes Assay: LC-MS/MS, HPLC-radiodetection, NMR
Compound: Darolutamide, [^{14}C]darolutamide

Assignment	^{12}C-mass $[M+H]^+$ [m/z]	^{12}C-mass $[M-H]^-$ [m/z]	Mass shift to drug [Da]	Molecular formula	Structure proposal
M-40	299.9846	297.9689	-99	$C_{10}H_6N_3O_4ClS$	

n.d. = not detectable

Test article: Darolutamide

Table 10-5: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, UGT Phenotyping

Location: 4.2.2.4.6
Report no.: PH-40077

Species / strain: Human / n.a. Study type: in vitro
Material: Various UGT isoforms Assay: LC-MS/MS
Compound: Darolutamide, (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide

		Darolutamide				(*S*,*R*)-darolutamide				(*S*,*S*)-darolutamide			
UGT isoform	**conc [µM]**	**M-15b [nM]**	**M-15a [nM]**	**M-7b [nM]**	**M-7a [nM]**	**M-15b [nM]**	**M-15a [nM]**	**M-7b [nM]**	**M-7a [nM]**	**M-15b [nM]**	**M-15a [nM]**	**M-7b [nM]**	**M-7a [nM]**
UGT1A1	1	-	-	1.140	1.460	-	-	3.200	-	-	-	-	3.130
UGT1A3	1	-	-	1.530	-	-	-	3.440	-	-	-	-	2.000
UGT1A4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT1A6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT1A7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.030
UGT1A8	1	-	-	-	1.930	-	-	-	-	-	-	-	3.910
UGT1A9	1	-	-	3.900	28.300	-	-	6.600	-	-	-	-	48.100
UGT1A10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT2B4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT2B7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT2B10	1	-	1.560	-	-	1.310	-	-	-	-	3.050	-	-
UGT2B15	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT2B17	1	-	-	-	1.870	-	-	-	-	-	-	-	2.960
UGT Insect Control	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Only values above 0.1% conversion (1nM) are given
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-6: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, UGT Phenotyping

Location: 4.2.2.4.6
Report no.: PH-40077

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Various microsomes	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	Darolutamide		

Enzyme	Protein [mg/mL]	M-15b V [pmol/(mg·min)]	M-15a V [pmol/(mg·min)]	M-7b V [pmol/(mg·min)]	M-7a V [pmol/(mg·min)]
HLM	0.5	0.041	0.101	0.024	0.105
HRM	0.5	0.004	0.001	0.023	0.160
HIM	0.5	0.004	0.003	0.013	0.205

HIM = human intestinal microsomes
HRM = human renal microsomes
HLM = human liver microsomes
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, UGT Phenotyping

Location: 4.2.2.4.6
Report no.: PH-40077

Species / strain:	Human/n.a.			Study type:	in vitro					
Material:	Human liver microsomes (pooled)			Assay:	LC-MS/MS					
Compound:	Darolutamide (1 µM)									
Inhibitor	**c [Inhibitor]** [µM]	**N**	**M-7a** [ratio area]	**M-7a** % control	**M-15a** [ratio area]	**M-15a** % control	**M-7b** [ratio area]	**M-7b** % control	**M-15b** [ratio area]	**M-15b** % control
Control (DMSO/H_2O 1+1)	-	2	0.084	n.a.	0.083	n.a.	0.019	n.a.	0.028	n.a.
Atazanavir	10	2	0.072	85.8	0.090	108.7	0.010	55.0	0.029	103.7
Control (DMSO)	-	2	0.074	n.a.	0.083	n.a.	0.017	n.a.	0.030	n.a.
Niflumic Acid	10	2	0.037	50.5	0.087	105.9	0.011	65.2	0.032	104.5
Control -UDPGA	-	1	0.000		0.000		0.000		0.000	
Control (DMSO)	-	2	0.074	n.a.	0.116	n.a.	0.018	n.a.	0.045	n.a.
Hecogenin	10	2	0.071	96.0	0.143	122.9	0.018	99.5	0.055	120.4
Control (DMSO)	-	2	0.174	n.a.	0.195	n.a.	0.053	n.a.	0.074	n.a.
Desloratadine	25	2	0.172	99.1	0.041	21.0	0.051	95.5	0.028	37.7
Control (DMSO/H_2O 1+1)	-	2	0.138	n.a.	0.165	n.a.	0.041	n.a.	0.068	n.a.
Atazanavir+NFA	10	2	0.037	26.7	0.169	102.7	0.008	20.1	0.059	87.3

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-8: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, UGT Phenotyping

Location: 4.2.2.4.6
Report no.: PH-40077

Species / strain:	Human/n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Human liver microsomes	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	Darolutamide		

UGT Isoform	**Correlation coefficient (r^2)**			
	M-7a	**M-15a**	**M-7b**	**M-15b**
UGT1A1	0.38	0.11	0.64	0.13
UGT1A9	0.54	0.10	0.65	0.12
UGT2B7	0.44	0.53	0.28	0.51
UGT2B10	0.57	0.83	0.59	0.84
UGT2B15	0.34	0.48	0.19	0.46

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-9: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Alcohol Dehydrogenase (ADH) Metabolism

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant ADH cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*R*)-darolutamide							Formation (*S*,*S*)-darolutamide			Keto-darolutamide		
ADH-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]			Replicate [µg/L]		
1B	0	<49.7[a]	803	867	835	45.3	5.42	100	<5.03	<5.03	<5.03	<15.0	<15.0	<15.0
	3	800	773	868	814	49.0	6.02	97.4	<5.03	<5.03	<5.03	<15.0	<15.0	<15.0
	6	991	959	996	982	20.1	2.04	118	<5.03	<5.03	49.0	<15.0	<15.0	34.8
1C	0	783	826	807	805	21.5	2.68	100	88.1	77.3	26.2	84.1	66.2	<15.0
	3	880	782	878	847	56.0	6.62	105	36.9	54.9	106	22.0	48.2	118
	6	1010	957	905	957	52.5	5.48	119	104	38.5	40.7	108	21.6	19.6
4	0	745[a]	790	801	796	7.78	0.978	100	34.4	24.8	57.8	23.5	<15.0	45
	3	847	732	807	795	58.4	7.34	100	31.3	43.4	30.0	16.8	31.4	17.3
	6	859	953	913	908	47.2	5.19	114	30.2	300	132	<15.0	319	130
5	0	802	887	859	849	43.3	5.10	100	31.0	110	46.5	16.1	119	37.7
	3	730	828	861	806	68.1	8.45	94.9	21.5	27.5	28.0	<15.0	<15.0	<15.0
	6	870	1000	936	935	65.0	6.95	110	34.2	36.1	33.3	19.8	17.5	15.2
6	0	839	843	838	840	2.65	0.315	100	39.3	20.0	18.7	25.4	<15.0	<15.0
	3	862	774	847	828	47.1	5.69	98.5	49.2	16.6	17.0	32.7	<15.0	<15.0
	6	958	963	953	958	5.00	0.522	114	33.5	21.8	19.4	20.0	<15.0	<15.0

Test article: Darolutamide

Table 10-9: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Alcohol Dehydrogenase (ADH) Metabolism (continued)

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant ADH cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*R*)-darolutamide							Formation (*S*,*S*)-darolutamide			Keto-darolutamide		
ADH-Isoform	**Incubation time [h]**	**Replicate[µg/L]**			**Mean Conc. [µg/L]**	**SD [µg/L]**	**%CV**	**% Remaining**	**Replicate [µg/L]**			**Replicate [µg/L]**		
with	0	900	837	868	868	31.5	3.63	100	64.9	50.9	33.0	52.0	39.0	16.5
NADH	3	808	727	791	775	42.7	5.51	89.3	21.0	21.7	37.9	21.8	25.5	48.7
HLC	6	957	994	1020	990	31.7	3.2	114	105	25.8	28.2	128	37.5	39.7
without	0	867	881	891	880	12.1	1.37	100	29.6	25.1	62.4	16.9	<15.0	47.1
NADH	3	763	883	968	871	103	11.8	99.1	12.9	188	44.2	18.5	169	44.6
HLC	6	1030	1010	1050	1030	20.0	1.94	117	<5.03	23.8	37.8	20.9	29.4	48.6

a = value excluded from calculation of mean
HLC = Human liver cytosol
< = value below lower limit of quantitation
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-10: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Alcohol Dehydrogenase (ADH) Metabolism

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant ADH cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*S*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*S*)-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide			Keto-darolutamide		
ADH-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]			Replicate [µg/L]		
1B	0	958	840	775	858	92.8	10.8	100	239	<49.7	<49.7	235	<15.0	<15.0
	3	884	958	861	901	50.7	5.63	105	<49.7	189	184	43.8	187	190
	6	1040	978	932	983	54.2	5.51	115	122	<49.7	<49.7	132	18.1	<15.0
1C	0	743	1310	810	954	310	32.5	100	<49.7	541	<49.7	<15.0	533	<15.0
	3	856	839	790	828	34.3	4.14	86.8	<49.7	<49.7	<49.7	16.4	<15.0	<15.0
	6	1120	926	889	978	124	12.7	103	175	<49.7	<49.7	184	18.0	<15.0
4	0	775	784	809	789	17.6	2.23	100	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
	3	825	804	820	816	11.0	1.34	103	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
	6	937	950	862	916	47.5	5.18	116	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
5	0	752	826	805	794	38.1	4.80	100	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
	3	798	810	775	794	17.8	2.24	100	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
	6	872	853	921	882	35.1	3.98	111	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
6	0	807	857	843	836	25.8	3.09	100	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
	3	858	808	745	804	56.6	7.05	96.2	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0
	6	938	977	1010	975	36.0	3.70	117	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	<15.0

Test article: Darolutamide

Table 10-10: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Alcohol Dehydrogenase (ADH) Metabolism (continued)

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant ADH cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*S*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*S*)-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide			Keto-darolutamide		
ADH-Isoform	**Incubation time [h]**	**Replicate[µg/L]**			**Mean Conc. [µg/L]**	**SD [µg/L]**	**%CV**	**% Remaining**	**Replicate [µg/L]**			**Replicate [µg/L]**		
with	0	760	806	808	791	27.2	3.43	100	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	15.4	15.8
NADH	3	614	635	536	595	52.2	8.77	75.2	<49.7	<49.7	<49.7	245	254	211
HLC	6	579	625	479	561	74.6	13.3	70.9	<49.7	<49.7	<49.7	380	402	314
without	0	774	785	830	796	29.7	3.73	100	<49.7	<49.7	<49.7	<15.0	<15.0	16.8
NADH	3	402	379	362	381	20.1	5.27	47.8	<49.7	<49.7	<49.7	475	476	403
HLC	6	233	261	271	255	19.7	7.72	32.0	<49.7	<49.7	<49.7	670	739	784

n.a. = not applicable
HLC = Human liver cytosol
< = value below lower limit of quantitation

Test article: Darolutamide

Table 10-11: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Alcohol Dehydrogenase (ADH) Metabolism

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant ADH cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	Keto-darolutamide 5 µM		

		Compound Keto-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide			(*S*,*S*)-darolutamide		
ADH-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]			Replicate [µg/L]		
1B	0	134	135	134	134	0.577	0.430	100	<49.7	<49.7	<49.7	7.61	<5.03	15.0
	3	144	139	146	143	3.61	2.52	106	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
	6	172	150	155	159	11.5	7.25	118	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	5.79	<5.03
1C	0	81.4	79.3	75.8	78.8	2.83	3.59	100	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
	3	77.8	78.2	77.6	77.9	0.306	0.392	98.8	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	17.7	<5.03
	6	99.1	86.0	87.8	91.0	7.10	7.81	115	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	21.9	7.02
4	0	101	89.5	86.0	92.2	7.85	8.51	100	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
	3	93.9	89.7	94.2	92.6	2.52	2.72	100	<49.7	<49.7	<49.7	7.28	<5.03	<5.03
	6	117	94.8	108	107	11.2	10.5	116	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
5	0	55.7	63.9	58.3	59.3	4.19	7.07	100	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
	3	59.4	62.6	58.9	60.3	2.01	3.33	102	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
	6	72.3	67.2	67.5	69.0	2.86	4.15	116	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	6.35	<5.03
6	0	108	136	125	123	14.1	11.5	100	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	6.23
	3	114	131	125	123	8.62	6.99	100	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
	6	177	140	143	153	20.6	13.4	125	<49.7	<49.7	<49.7	44.7	<5.03	<5.03

Test article: Darolutamide

Table 10-11: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Alcohol Dehydrogenase (ADH) Metabolism (continued)

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant ADH cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	Keto-darolutamide 5 µM		

		Compound Keto-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide			Formation (*S*,*S*)-darolutamide		
ADH-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]			Replicate [µg/L]		
with	0	65.2	68.0	69.9	67.7	2.36	3.49	100	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
NADH	3	54.0	59.3	69.0	60.8	7.61	12.5	89.8	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	5.05	6.04
HLC	6	66.1	60.2	76.5	67.6	8.25	12.2	100	<49.7	<49.7	<49.7	12.6	12.7	14.9
without	0	46.5	57.9	56.5	53.6	6.22	11.6	100	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
NADH	3	46.0	52.2	60.8	53.0	7.43	14.0	98.8	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03
HLC	6	64.3	61.3	63.7	63.1	1.59	2.52	118	<49.7	<49.7	<49.7	<5.03	<5.03	<5.03

n.a. = not applicable
HLC = Human liver cytosol
< = value below lower limit of quantitation

Test article: Darolutamide

Table 10-12: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Aldo-Keto Reductase (AKR) Metabolism

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant AKR cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*R*)-darolutamide							Formation (*S*,*S*)-darolutamide			Formation Keto-darolutamide		
AKR-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]			Replicate [µg/L]		
1A1	0	746	782	822	783	38.0	4.85	100	15.8	19.5	19.9	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	763	766	762	764	2.08	0.273	97.5	18.0	19.0	18.7	<1.50	<1.50	<1.50
	1	768	760	778	769	9.02	1.17	98.1	17.6	18.7	18.6	<1.50	<1.50	<1.50
1B1	0	767	790	809	789	21.0	2.67	100	17.9	19.8	19.8	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	729	736	758	741	15.1	2.04	94.0	18.3	15.7	19.3	<1.50	<1.50	<1.50
	1	755	765	747	756	9.02	1.19	95.8	19.0	17.4	18.3	<1.50	<1.50	<1.50
1B10	0	743	784	812	780	34.7	4.45	100	17.0	19.6	19.5	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	725	737	743	735	9.17	1.25	94.3	17.4	18.1	18.2	<1.50	<1.50	<1.50
	1	773	761	742	759	15.6	2.06	97.3	18.9	17.8	18.1	<1.50	<1.50	<1.50
1C1	0	803	802	809	805	3.79	0.470	100	18.6	19.8	19.8	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	759	781	748	763	16.8	2.20	94.8	18.1	22.3	22.1	<1.50	<1.50	<1.50
	1	777	778	736	764	24.0	3.14	94.9	19.3	22.6	21.9	<1.50	<1.50	<1.50
1C2	0	796	780	795	790	8.96	1.13	100	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	764	798	774	779	17.5	2.24	98.5	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
	1	800	785	765	783	17.6	2.24	99.1	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
1C3	0	795	782	742	773	27.6	3.57	100	NR	NR	NR	2.60	2.87	2.06
	0.5	738	770	745	751	16.8	2.24	97.2	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
	1	782	778	760	773	11.7	1.52	100	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50

Test article: Darolutamide

Table 10-12: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Aldo-Keto Reductase (AKR) Metabolism (continued)

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant AKR cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*R*)-darolutamide							Formation (*S*,*S*)-darolutamide			Keto-darolutamide		
AKR-Isoform	**Incubation time [h]**	**Replicate[µg/L]**			**Mean Conc. [µg/L]**	**SD [µg/L]**	**%CV**	**% Remaining**	**Replicate [µg/L]**			**Replicate [µg/L]**		
1C4	0	828	781	786	798	25.8	3.23	100	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	787	766	782	778	11.0	1.41	97.5	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
	1	807	768	771	782	21.7	2.78	98.0	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
1D1	0	851	800	777	809	37.9	4.68	100	NR	NR	NR	<1.50	1.64	<1.50
	0.5	850	820	773	814	38.8	4.77	101	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
	1	767	805	753	775	26.9	3.47	95.8	NR	NR	NR	<1.50	<1.50	<1.50
with	0	888	774	691	784	98.9	12.6	100	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	728	679	757	721	39.4	5.47	92.0	<1.51	17.9	<1.51	45.2	38.6	52.4
HLM	1	648	725	664	679	40.6	5.98	86.6	<1.51	<1.51	22.5	65.7	75.9	62.9
without	0	761	818	783	787	28.7	3.65	100	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	713	826	756	765	57.0	7.46	97.2	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
HLM	1	845	812	782	813	31.5	3.88	103	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
with	0	799	703	806	769	57.6	7.48	100	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	785	739	776	767	24.4	3.18	99.7	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
HLC	1	779	702	723	735	39.8	5.42	95.5	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
without	0	<24.9[a]	771	789	780	12.7	1.63	100	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	778	766	779	774	7.23	0.934	99.3	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0
HLC	1	737	761	758	752	13.1	1.74	96.4	<1.51	<1.51	<1.51	<25.0	<25.0	<25.0

n.a. = not applicable HLM = Human liver microsomes HLC = Human liver cytosol < = value below lower limit of quantitation
NR = not reported a = value excluded from calculation of mean

Test article: Darolutamide

Table 10-13: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Aldo-Keto Reductase (AKR) Metabolism

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant AKR cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*S*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*S*)-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide			Keto-darolutamide		
AKR-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]			Replicate [µg/L]		
1A1	0	775	757	779	770	11.7	1.52	100	3.45	3.01	2.87	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	834	668	770	757	83.7	11.1	98.3	3.59	2.81	2.80	<1.50	<1.50	<1.50
	1	886	632	763	760	127	16.7	98.7	3.67	3.05	2.94	<1.50	<1.50	<1.50
1B1	0	<1.51[a]	759	816	788	40.3	5.12	100	<1.49	2.13	2.58	<1.50	<1.50	<1.50
	0.5	744	668	710	707	38.1	5.38	89.8	2.42	2.41	2.71	<1.50	<1.50	<1.50
	1	790	653	774	739	74.9	10.1	93.8	2.21	2.27	2.68	<1.50	<1.50	<1.50
1B10	0	802	713	730	748	47.2	6.31	100	9.74	2.95	2.48	<1.50	3.75	2.81
	0.5	797	555	603	652	128	19.7	87.1	2.43	2.69	2.41	2.08	8.07	10.2
	1	778	561	706	682	111	16.2	91.1	2.46	2.43	2.23	5.25	6.34	3.29
1C1	0	787	735	730	751	31.6	4.20	100	3.22	2.78	4.58	2.69	4.36	6.50
	0.5	766	682	689	712	46.6	6.54	94.9	2.78	3.19	2.57	4.40	3.67	4.02
	1	805	655	718	726	75.3	10.4	96.7	2.37	3.19	2.72	3.39	3.62	4.53
1C2	0	835	810	843	829	17.2	2.08	100	3.06	3.40	2.83	3.74	2.54	<1.50
	0.5	840	715	802	786	64.1	8.16	94.7	3.29	2.71	4.29	2.27	2.22	2.98
	1	825	701	794	773	64.5	8.34	93.2	3.09	3.12	3.22	3.13	2.02	2.31
1C3	0	817	673	747	746	72.0	9.66	100	3.20	3.16	4.03	59.5	58.3	62.1
	0.5	767	694	767	743	42.1	5.68	99.6	3.54	2.79	6.89	16.2	7.13	9.20
	1	873	623	679	725	131	18.1	97.2	3.72	3.02	2.43	4.53	14.2	20.0

Test article: Darolutamide

Table 10-13: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Aldo-Keto Reductase (AKR) Metabolism (continued)

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant AKR cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*S*)-darolutamide 5 µM		

		Compound (*S*,*S*)-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide			Keto-darolutamide		
AKR-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]			Replicate [µg/L]		
1C4	0	893	732	608	744	143	19.2	100	3.65	2.94	2.72	4.53	4.57	3.97
	0.5	863	695	737	765	87.4	11.4	103	3.59	3.18	2.27	2.61	3.82	4.56
	1	871	874	806	850	38.4	4.52	114	3.43	4.02	2.71	2.09	3.11	1.58
1D1	0	929	629	741	766	152	19.8	100	2.75	2.74	3.16	2.78	<1.50	3.07
	0.5	908	742	769	806	89.1	11.0	105	3.99	3.53	2.49	2.33	<1.50	1.61
	1	1120	727	808	885	208	23.4	115	5.16	2.83	2.89	2.54	<1.50	5.93
with	0	809	703	762	758	53.1	7.01	100	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	691	742	692	708	29.2	4.12	93.4	<24.9	<24.9	<24.9	30.0	31.0	30.3
HLM	1	766	673	717	719	46.5	6.47	94.8	<24.9	<24.9	<24.9	51.3	48.4	46.7
without	0	706	780	768	751	39.7	5.29	100	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	590	818	781	730	122	16.8	97.1	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
HLM	1	678	818	785	760	73.2	9.63	101	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
with	0	753	791	806	783	27.3	3.49	100	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	737	750	781	756	22.6	2.99	96.5	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
HLC	1	824	745	772	780	40.2	5.15	100	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
without	0	852	719	775	782	66.8	8.54	100	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
NADPH	0.5	691	740	734	722	26.7	3.70	92.3	<24.9	<24.9	<24.9	<25.0	<25.0	<25.0
HLC	1	771	782	714	756	36.5	4.83	96.6	<24.9	<24.9	<24.9	44.3	46.7	47.3

a = value excluded from calculation of mean, HLM = Human liver microsomes, HLC = Human liver cytosol, < = value below lower limit of quantitation
n.a.= not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-14: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Aldo-Keto Reductase (AKR) Metabolism

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Recombinant AKR cytosolic protein	Assay:	LC-MS/MS
Compound:	Keto-darolutamide 5 µM		

		Compound Keto-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide			Formation (*S*,*S*)-darolutamide		
AKR-Isoform	**Incubation time [h]**	**Replicate[µg/L]**			**Mean Conc. [µg/L]**	**SD [µg/L]**	**%CV**	**% Remaining**	**Replicate [µg/L]**			**Replicate [µg/L]**		
1A1	0	171	263	299	244	66.0	27.0	100	<1.49	<1.49	<1.49	<1.51	<1.51	<1.51
	0.5	141	221	283	215	71.2	33.1	88.0	<1.49	<1.49	<1.49	16.6	20.6	25.9
	1	116	197	260	191	72.2	37.8	78.2	<1.49	<1.49	<1.49	31.1	46.9	58.7
1B1	0	78.7	70.9	77.4	75.7	4.18	5.52	100	<1.49	<1.49	<1.49	<1.51	<1.51	<1.51
	0.5	61.8	61.3	67.1	63.4	3.21	5.07	83.8	<1.49	<1.49	<1.49	3.62	3.33	3.78
	1	54.2	61.8	57.7	57.9	3.80	6.57	76.5	<1.49	<1.49	<1.49	6.68	7.41	6.62
1B10	0	57.6	50.4	53.2	53.7	3.63	6.75	100	<1.49	<1.49	<1.49	<1.51	<1.51	<1.51
	0.5	39.9	42.3	45.5	42.6	2.81	6.60	79.2	<1.49	<1.49	<1.49	5.24	5.53	6.00
	1	31.8	38.3	36.9	35.7	3.42	9.59	66.4	<1.49	<1.49	<1.49	9.76	11.1	11.2
1C1	0	63.7	65.4	67.7	65.6	2.01	3.06	100	<1.49	<1.49	<1.49	<1.51	<1.51	<1.51
	0.5	33.9	51.7	39.0	41.5	9.17	22.1	63.3	<1.49	<1.49	<1.49	21.2	32.8	23.2
	1	20.3	33.7	23.2	25.7	7.05	27.4	39.2	<1.49	<1.49	<1.49	31.3	50.0	37.1
1C2	0	184	136	91.8	137	46.1	33.6	100	<1.49	1.79	<1.49	<1.51	2.15	<1.51
	0.5	174	134	76.2	128	49.2	38.4	93.3	3.80	1.90	<1.49	16.1	12.3	6.66
	1	138	124	71.8	111	34.9	31.4	81.1	2.36	2.24	<1.49	25.5	22.3	13.6

Test article: Darolutamide

Table 10-14: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Aldo-Keto Reductase (AKR) Metabolism (continued)

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.							Study type:	in vitro						
Material:	Recombinant AKR cytosolic protein							Assay:	LC-MS/MS						
Compound:	Keto-darolutamide 5 µM														
		Compound Keto-darolutamide							Formation (*S*,*R*)-darolutamide				(*S*,*S*)-darolutamide		
AKR-Isoform	Incubation time [h]	Replicate[µg/L]			Mean Conc. [µg/L]	SD [µg/L]	%CV	% Remaining	Replicate [µg/L]				Replicate [µg/L]		
1C3	0	26.7	36.5	29.3	30.8	5.08	16.5	100	<1.49	<1.49	<1.49		22.0	24.0	24.5
	0.5	<1.50	<1.50	<1.50	<1.50	n.a.	n.a.	n.a.	<1.49	<1.49	<1.49		45.2	48.2	50.7
	1	1.60	<1.50	<1.50	<1.50	n.a.	n.a.	n.a.	<1.49	<1.49	<1.49		40.4	60.2	47.5
1C4	0	41.3	44.7	49.4	45.1	4.07	9.01	100	<1.49	<1.49	<1.49		<1.51	<1.51	<1.51
	0.5	37.2	40.5	40.3	39.3	1.85	4.70	87.1	<1.49	<1.49	<1.49		5.54	5.95	6.02
	1	26.4	39.1	28.2	31.2	6.87	22.0	69.2	<1.49	<1.49	<1.49		8.92	12.9	9.92
1D1	0	45.2	39.2	41.9	42.1	3.00	7.14	100	<1.49	<1.49	<1.49		<1.51	<1.51	<1.51
	0.5	18.4	20.0	16.1	18.2	1.96	10.8	43.2	<1.49	<1.49	<1.49		24.6	25.4	23.0
	1	5.05	10.3	3.45	6.27	3.58	57.2	14.9	<1.49	<1.49	<1.49		31.5	45.2	35.3

Test article: Darolutamide

Table 10-14: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Aldo-Keto Reductase (AKR) Metabolism (continued)

Location: 4.2.2.4.7
Report no.: R-9722

Species / strain:	Human / n.a.							Study type:	in vitro					
Material:	Recombinant AKR cytosolic protein							Assay:	LC-MS/MS					
Compound:	Keto-darolutamide 5 µM													
		Compound							**Formation**					
		Keto-darolutamide							**(*S*,*R*)-darolutamide**			**(*S*,*S*)-darolutamide**		
AKR-Isoform	**Incubation time [h]**	**Replicate[µg/L]**			**Mean Conc. [µg/L]**	**SD [µg/L]**	**%CV**	**% Remaining**	**Replicate [µg/L]**			**Replicate [µg/L]**		
with	0	47.6	41.7	55.1	48.1	6.72	14.0	100	<24.9	<24.9	<24.9	<1.51	<1.51	<1.51
NADPH	0.5	41.3	34.5	42.4	39.4	4.28	10.9	81.9	<24.9	<24.9	<24.9	3.30	2.37	3.34
HLM	1	44.2	37.2	33.2	38.2	5.57	14.6	79.4	<24.9	<24.9	<24.9	5.76	4.31	5.12
without	0	49.1	51.7	51.3	50.7	1.40	2.76	100	<24.9	<24.9	<24.9	<1.51	<1.51	<1.51
NADPH	0.5	55.3	46.3	46.5	49.4	5.14	10.4	97.4	<24.9	<24.9	<24.9	<1.51	<1.51	<1.51
HLM	1	64.0	53.0	55.1	57.4	5.84	10.2	113	<24.9	<24.9	<24.9	<1.51	<1.51	<1.51
with	0	56.5	57.6	68.5	60.9	6.63	10.9	100	<24.9	<24.9	<24.9	<1.51	<1.51	<1.51
NADPH	0.5	<25.0	<25.0	<25.0	<25.0	n.a.	n.a.	n.a.	<24.9	<24.9	<24.9	65.5	62.4	65.6
HLC	1	<25.0	<25.0	<25.0	<25.0	n.a.	n.a.	n.a.	<24.9	<24.9	<24.9	74.2	57.7	73.0
without	0	60.7	63.3	71.2	65.1	5.47	8.40	100	<24.9	<24.9	<24.9	<1.51	<1.51	<1.51
NADPH	0.5	59.0	63.7	58.1	60.3	3.01	4.99	92.6	<24.9	<24.9	<24.9	<1.51	<1.51	<1.51
HLC	1	63.2	65.1	60.9	63.1	2.10	3.33	96.9	<24.9	<24.9	<24.9	2.07	<1.51	<1.51

n.a. = not applicable
HLM = Human liver microsomes
HLC = Human liver cytosol
< = value below lower limit of quantitation

Test article: Darolutamide

Table 10-15: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Enzyme Involved

Location: 4.2.2.4.5
Report no.: PH-40290

Species / strain:	Human / n.a.		Study type:	in vitro			
Material:	Human liver microsomes / recombinant CYP isoforms						
Compound:	[^{14}C]darolutamide		Assay:	LC-MS/MS			
CYP isoform	**Incubation time [min]**	**[^{14}C]darolutamide**	**M-1**	**M-31**	**M-30**	**M-26**	**Unknown**
CYP1A1	60	65.6	7.4	-	-	8.4	18.6
CYP1A2	60	97.4	1.5	1.0	-	-	-
CYP1B1	60	97.0	2.4	-	0.5	-	-
CYP2A6	60	98.3	1.7	-	-	-	-
CYP2B6	60	98.9	1.1	-	-	-	-
CYP2C8	60	98.4	1.6	-	-	-	-
CYP2C9	60	98.6	1.4	-	-	-	-
CYP2C18	60	97.6	2.4	-	-	-	-
CYP2C19	60	95.2	2.8	-	-	0.6	1.4
CYP2D6	60	95.8	3.4	-	0.8	-	-
CYP2E1	60	96.5	3.0	-	-	-	0.5
CYP2J2	60	98.1	1.9	-	-	-	-
CYP3A4	15	68.1	20.1	9.4	-	2.5	-
CYP3A4	60	16.4	-	54.0	19.4	9.8	0.4
CYP3A5	60	86.9	11.7	-	1.4	-	-
CYP3A7	60	98.2	1.8	-	-	-	-
CYP4A11	60	98.0	1.5	-	-	-	0.6
CYP4F2	60	100.0	-	-	-	-	-
CYP4F3A	60	96.7	1.9	-	-	0.7	0.7
CYP4F3B	60	98.7	1.3	-	-	-	-
CYP4F12	60	98.3	1.2	-	-	-	0.5
CYP19	60	93.9	6.1	-	-	-	-

Test article: Darolutamide

Table 10-15: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Enzyme Involved (continued)

Location: 4.2.2.4.5
Report no.: PH-40290

Species / strain:	Human / n.a.		Study type:	in vitro			
Material:	Human liver microsomes / recombinant CYP isoforms						
Compound:	[^{14}C]darolutamide		Assay:	LC-MS/MS			
CYP isoform	**Incubation time [min]**	**[^{14}C]darolutamide**	**M-1**	**M-31**	**M-30**	**M-26**	**Unknown**
Ctrl Supers.	60	98.8	1.2	-	-	-	-
Ctrl Supers+b5	60	99.2	0.8	-	-	-	-
HLM	60	89.0	8.6	-	1.5	0.9	-
HLM no NADPH	60	97.8	2.2	-	-	-	-

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 10-16: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Enzyme Involved

Location: 4.2.2.4.5
Report no.: PH-40290

Species / strain:	Human / n.a.		Study type:	in vitro	
Material:	Human hepatocyte				
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide		Assay:	LC-MS/MS	
Inhibitor	**$t_{1/2}$**	**CL_{int}**	**Ratio to control**	**CL'_{blood} (well-stirred)**	**Ratio to control**
	[min]	**[µL/min/10^6 cells]**		**[L/h/kg]**	
(*S*,*R*)-darolutamide					
w/o	93	7.4	-	0.58	-
Cobicistat	252	2.8	0.37	0.30	0.51
BAY 1128688	120	5.8	0.78	0.50	0.86
Xanamem	180	3.8	0.52	0.38	0.66
Menadione	307	2.3	0.30	0.25	0.44
(*S*,*S*)-darolutamide					
w/o	108	6.4	-	0.53	-
Cobicistat	152	4.6	0.71	0.43	0.81
BAY 1128688	38	18.2	2.84	0.87	1.63
Xanamem	113	6.1	0.96	0.52	0.98
Menadione	73	9.5	1.48	0.66	1.24

n.a. = not applicable
w/o =without
Cobicistat: irrev. CYP3A4 inhibitor (1 µM)
BAY 1128688: BAYER in-house AKR1C3 inhibitor (1 µM)
Xanamem: 11ß HSD inhibitor (1 µM)
Menadione: inhibitor of carbonyl reductase (50 µM)

Test article: Darolutamide

Table 10-17: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Enzyme Involved

Location: 4.2.2.4.5
Report no.: PH-40290

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro		
Material:	Human liver microsomes / recombinant CYP isoforms				
Compound:	[^{14}C]keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS		

CYP isoform	Incubation time [min]	[^{14}C]keto-darolutamide	Darolutamide	M-31	M-30	M-26	M-25	Unknown
CYP1A1[a]	15	77.5[a]	traces	4.4[a]	-	12.3	1.5	3.7
CYP1A1[a]	60	3.3[a]	4.4	-[a]	-	11.2	6.0	74.1
CYP1A2	60	92.3	4.8	-	-	-	-	3.0
CYP1B1	60	86.5	13.5	-	-	-	-	-
CYP2A6+b5	60	97.8	2.2	-	-	-	-	-
CYP2B6+b5	60	97.4	2.6	-	-	-	-	-
CYP2C8+b5	60	92.0	8.0	-	-	-	-	-
CYP2C9+b5	60	96.9	3.1	-	-	-	-	-
CYP2C18+b5	60	97.6	2.4	-	-	-	-	-
CYP2C19+b5	60	96.0	2.8	-	-	-	0.7	0.5
CYP2D6[a]	60	95.8[a]	4.2	-	-	-	-	-
CYP2E1+b5	60	99.2	0.8	-	-	-	-	-
CYP2J2+b5	60	96.4	3.6	-	-	-	-	-
CYP3A4+b5[a]	60	9.7[a]	traces	46.5[a]	36.7	7.1	-	-
CYP3A5+b5	60	94.7	5.3	-	-	-	-	-
CYP3A7+b5	60	97.8	2.2	-	-	-	-	-
CYP4A11	60	88.0	10.2	-	-	-	1.7	-
CYP4F2+b5	60	91.0	9.0	-	-	-	-	-
CYP4F3A+b5	60	87.1	12.9	-	-	-	-	-
CYP4F3B+b5	60	95.5	4.5	-	-	-	-	-
CYP4F12+b5	60	98.2	1.8	-	-	-	-	-
CYP19	60	96.6	3.4	-	-	-	-	-

Test article: Darolutamide

Table 10-17: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Enzyme Involved (continued)

Location: 4.2.2.4.5
Report no.: PH-40290

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro	
Material:	Human liver microsomes / recombinant CYP isoforms			
Compound:	[^{14}C]keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS	

CYP isoform	Incubation time [min]	[^{14}C]keto-darolutamide	Darolutamide	M-31	M-30	M-26	M-25	Unknown
Ctrl Supers.	60	92.4	7.6	-	-	-	-	-
Ctrl Supers+b5	60	90.6	9.4	-	-	-	-	-
HLM[a]	60	43.2[a]	26.2	14.8[a]	11.5	2.9	1.5	-
HLM w/o NADP	60	100.0	-	-	-	-	-	-

n.a. = not applicable
a = additional analysis based on MS responses to separate keto-darolutamide and M-31
(evaluations considered MS-response of reference compounds keto-darolutamide and M-31)
w/o = without

Test article: Darolutamide

Table 10-18: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP substrate characteristics

Location: 4.2.2.4.5
Report no.: PH-40290

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro		
Material:	Human hepatocyte				
Compound:	keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS		

Inhibitor	**$t_{1/2}$ [min]**	**CL_{int} [µL/min/10^6 cells]**	**Ratio to control**	**CL'_{blood} (well-stirred) [L/h/kg]**	**Ratio to control**
Keto-Darolutamide					
w/o	7.6	91.7	-	1.20	-
Cobicistat	8.6	80.4	0.88	1.18	0.99
BAY 1128688	104	6.7	0.07	0.54	0.46
Xanamem	9.8	70.7	0.77	1.16	0.97
Menadione	3603	0.2	0.002	0.03	0.02

n.a. = not applicable
w/o = without
Cobicistat: irrev. CYP3A4 inhibitor (1 µM)
BAY 1128688: BAYER in-house AKR1C3 inhibitor (1 µM)
Xanamem: 11ß HSD inhibitor (1 µM)
Menadione: inhibitor of carbonyl reductase (50 µM)

2.6.5.11 薬物動態試験： 推定代謝経路

推定代謝経路については2.6.4.5を参照。

2.6.5.12 薬物動態試験： 薬物代謝酵素の誘導／阻害

Test article: Darolutamide

Table 12-1: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Inhibitory Potential

Location: 4.2.2.4.8
Report no.: R-9943

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Human liver microsomes		
Compound:	Darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

CYP isoform	Substrate	Enzyme source	IC_{50} [µM]	IC_{50} positive control inhibitor [µM]
CYP1A2	Phenacetin	Human liver microsomes	> 100	0.02
CYP2A6	Coumarin	Human liver microsomes	> 100	0.17
CYP2B6	Bupropion	Human liver microsomes	> 100	0.17
CYP2C8	Paclitaxel	Human liver microsomes	> 100	3.8
CYP2C9	Diclofenac	Human liver microsomes	30.3	0.66
CYP2C19	(S)-mephenytoin	Human liver microsomes	64.1	4.0
CYP2D6	Bufuralol	Human liver microsomes	81.9	0.06
CYP2E1	Chlorzoxazone	Human liver microsomes	n.i.	14.0
CYP3A4	Midazolam	Human liver microsomes	> 100	0.01
CYP3A4	Testosterone	Human liver microsomes	> 100	0.03

n.a. = not applicable
n.i. = no inhibition within the tested concentration range

Test article: Darolutamide

Table 12-2: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Inhibitory Potential

Location: 4.2.2.4.9
Report no.: R-9948

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Human liver microsomes		
Compound:	Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

CYP isoform	Substrate	Enzyme source	IC_{50} [µM]	IC_{50} positive control inhibitor [µM]
CYP1A2	Phenacetin	Human liver microsomes	> 100[a]	0.03
CYP2A6	Coumarin	Human liver microsomes	n.i.	0.20
CYP2B6	Bupropion	Human liver microsomes	54.2	0.07
CYP2C8	Paclitaxel	Human liver microsomes	48.6	5.9
CYP2C9	Diclofenac	Human liver microsomes	9.6[a]	0.92
CYP2C19	(S)-mephenytoin	Human liver microsomes	39.5	5.7
CYP2D6	Bufuralol	Human liver microsomes	51.9	0.10
CYP2E1	Chlorzoxazone	Human liver microsomes	n.i.	13.8
CYP3A4	Midazolam	Human liver microsomes	64.0[b]	0.02
CYP3A4	Testosterone	Human liver microsomes	50.8	0.04

n.a. = not applicable
n.i. = no inhibition tested within concentration range tested
a = Absolute IC_{50} calculated
b = IC_{50} calculated using non-linear regression where the bottom of the curve was fit to 0.

Test article: Darolutamide

Table 12-3: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Inhibitory Potential

Location: 4.2.2.4.10
Report no.: PH-39981

Species / strain:	Human / n.a.		Study type:	in vitro	
Material:	Human liver microsomes				
Compound:	Darolutamide		Assay:	LC-MS/MS	
CYP isoform	**Substrate reaction**	**Enzyme source**	**IC_{50} [µM]**	**Standard inhibitor**	**IC_{50} positive control inhibitor [µM]**
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	Human liver microsomes	> 100	Ketoconazole	0.02
CYP3A4	[$^{13}C_6$]Midazolam 1'-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	> 100	Mibefradil	0.11
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation	Human liver microsomes	> 100	Ketoconazole	0.02
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	> 100	Mibefradil	0.13

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 12-4: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Inhibitory Potential

Location: 4.2.2.4.11
Report no.: PH-39983

Species / strain:	Human / n.a.		Study type:	in vitro	
Material:	Human liver microsomes				
Compound:	Keto-darolutamide		Assay:	LC-MS/MS	
CYP isoform	**Substrate reaction**	**Enzyme source**	**IC_{50} [µM]**	**Standard inhibitor**	**IC_{50} positive control inhibitor [µM]**
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	Human liver microsomes	> 50	Ketoconazole	0.02
CYP3A4	[$^{13}C_6$]Midazolam 1'-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	> 50	Mibefradil	0.11
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation	Human liver microsomes	> 50	Ketoconazole	0.02
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	> 50	Mibefradil	0.13

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 12-5: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Inhibitory Potential

Location: 4.2.2.4.12
Report no.: PH-39984

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro	
Material:	Human liver microsomes, recombinant enzymes			
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS	

CYP isoform	Substrate reaction	Enzyme source	IC_{50} [µM]	Standard inhibitor	IC_{50} positive control inhibitor [µM]
CYP1A2	Phenacetin *O*-deethylation	Human liver microsomes	>50	Fluvoxamine	0.31
CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Tranylcypromine	0.74
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Ticlopidine	0.42
CYP2C8	Amodiaquine *N*-deethylation	Human liver microsomes	36.2	Montelukast	0.14
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylation	Human liver microsomes	22.6	Sulfaphenazole	0.41
CYP2C19	Mephenytoin 4'-hydroxylation	Human liver microsomes	46.7	(-)-*N*-3-Benzyl phenobarbital	0.47
CYP2D6	Dextromethorphan *O*-demethylation	Human liver microsomes	>50	Fluoxetine	0.61
CYP2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Methylpyrazole	6.3
CYP2J2	Ebastine hydroxylation	Recombinant	>50	HET0016	0.53
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Ketoconazole	0.02
CYP3A4	[$^{13}C_6$]Midazolam 1'-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	>50	Mibefradil	0.12
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Ketoconazole	0.03
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	>50	Mibefradil	0.14

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 12-6: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, CYP Inhibitory Potential

Location: 4.2.2.4.12
Report no.: PH-39984

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro	
Material:	Human liver microsomes, recombinant enzymes			
Compound:	(*S*,*S*)-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS	

CYP isoform	Substrate reaction	Enzyme source	IC_{50} [µM]	Standard inhibitor	IC_{50} positive control inhibitor [µM]
CYP1A2	Phenacetin *O*-deethylation	Human liver microsomes	>50	Fluvoxamine	0.31
CYP2A6	Coumarin 7-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Tranylcypromine	0.74
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Ticlopidine	0.42
CYP2C8	Amodiaquine *N*-deethylation	Human liver microsomes	46.3	Montelukast	0.14
CYP2C9	Diclofenac 4'-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Sulfaphenazole	0.41
CYP2C19	Mephenytoin 4'-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	(-)-*N*-3-Benzyl phenobarbital	0.47
CYP2D6	Dextromethorphan *O*-demethylation	Human liver microsomes	40.2	Fluoxetine	0.61
CYP2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Methylpyrazole	6.3
CYP2J2	Ebastine hydroxylation	Recombinant	>50	HET0016	0.53
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Ketoconazole	0.02
CYP3A4	$[^{13}C_6]$Midazolam 1'-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	>50	Mibefradil	0.12
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation	Human liver microsomes	>50	Ketoconazole	0.03
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation (30 min pre-incubation)	Human liver microsomes	>50	Mibefradil	0.14

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 12-7: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, UGT Inhibitory Potential

Location: 4.2.2.4.13
Report no.: R-11222

Species / strain: Human / n.a. Study type: in vitro
Material: Human liver microsomes
Assay: LC-MS/MS
Compound: (*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide, keto-darolutamide

UGT isofom	Substrate / product	(*S*,*R*)-darolutamide		(*S*,*S*)-darolutamide		Keto-darolutamide	
		IC_{50} ± SE [µM]	Ki ± SE [µM]	IC_{50} ± SE [µM]	Ki ± SE [µM]	IC_{50} ± SE [µM]	Ki ± SE [µM]
UGT1A1	Estradiol / Estradiol 3-glucuronide	26.5 ± 3.01	n.d.	31.7 ± 3.99	n.d.	6.41 ± 1.99	8.13 ± 2.28[a]
UGT1A4	Trifluoperazine / Trifluoperazine *N*-glucuronide	>100	n.d.	>100	n.d.	>50	n.d.
UGT1A6	Serotonin / Serotonin glucuronide	>100	n.d.	>100	n.d.	>50	n.d.
UGT1A9	Propofol / Propofol-*O*-glucuronide	12.5 ± 2.49	6.32 ±1.15[a]	>100	n.d.	>50	n.d.
UGT2B7	AZT / AZT 5'-glucuronide	>100	n.d.	>100	n.d.	>50	n.d.

a = competitive inhibition
n.a. = not applicable
n.d. = not determined
AZT = = 3'-azido-3'-deoxythyimidine

Test article: Darolutamide

Table 12-8: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Inhibition of Dihydropyrimidine Dehydrogenase

			Location:	4.2.2.4.14
			Report no.:	PH-40239
Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro	
Material:	Human liver cytosol			
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide, keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS	
(*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide and keto-darolutamide did not affect the biotransformation of 5-fluorouracil in vitro, as indicated by IC_{50} values > 50 µM.				

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 12-9: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Induction of CYP isoforms

Location: 4.2.2.4.15
Report no.: PH-40105

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Human hepatocyte (CYP3A4 mRNA)	Assay:	qPCR / LC-MS/MS
Compound:	Darolutamide, keto-darolutamide		

Test compound	**Darolutamide**				**Keto-darolutamide**			
				Overall assessment				**CYP Induction overall assessment**
	Donor 1	**Donor 2**	**Donor 3**		**Donor 1**	**Donor 2**	**Donor 3**	
E_{max} [fold induction]	6.8	3.3	10.0		4.0	4.6	9.7	
EC_{50} [µg/L]	2890	1472	4035		1071	2384	4160	
Dose [mg]	600	600	600		600	600	600	
Total $C_{max,ss}$ [µg/L]	3330	3330	3330		7980	7980	7980	
Free $C_{max,ss}$ [µg/L]	274	274	274		16	16	16	
PXR regulation				yes				yes
RIS model								
RIS value	0.59	0.52	0.64		0.06	0.03	0.04	
% Decrease in AUC of midazolam	82	84	82	strong inducer	58	50	51	weak to moderate inducer

n.a. = not applicable
PXR = pregnane X receptor
RIS = relative induction score

Test article: Darolutamide

Table 12-10: Pharmacokinetics: Metabolism in vitro, Induction of CYP isoforms

Location: 4.2.2.4.15
Report no.: PH-40105

Species / strain:	Human / n.a.	Study type:	in vitro
Material:	Human hepatocyte (CYP3A4 mRNA)	Assay:	qPCR / LC-MS/MS
Compound:	(*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide		

Test compound	**(*S*,*R*)-darolutamide**				**(*S*,*S*)-darolutamide**			
	Donor 1	**Donor 2**	**Donor 3**	**CYP Induction overall assessment**	**Donor 1**	**Donor 2**	**Donor 3**	**CYP Induction overall assessment**
E_{max} [fold induction]	11.7	2.7	20.3		3.0	2.6	21.7	
EC_{50} [µg/L]	5809	1112	11056		1129	1025	8417	
Dose [mg]	600	600	600		600	600	600	
Total $C_{max,ss}$ [µg/L]	684	684	684		2710	2710	2710	
Free $C_{max,ss}$ [µg/L]	55	55	55		21.7	217	217	
PXR regulation				yes				yes
RIS model								
RIS value	0.11	0.13	0.10		0.48	0.45	0.55	
% Decrease in AUC of midazolam	65	71	64	moderate inducer	80	83	81	moderate to strong inducer

n.a. = not applicable
PXR = pregnane X receptor
RIS = relative induction score

2.6.5.13 薬物動態試験： 累積排泄

Test article: Darolutamide

Table 13-1: Pharmacokinetics: Excretion, rodent

Location: 4.2.2.5.1
Report no.: R-9663

Species / strain:		Rat / Wistar			
Admin. compound:		[^{14}C]BAY 1841788			
Analyte:		Total radioactivity			
Feeding condition:		Fasted (food 2 h after dosing)			
Dose:	[mg/kg]	10 (actual: 6.38[a])		10 (actual: 11.12[b])	
Route:		Intravenous bolus		Oral	
Gender / No. of animals:		male / 4		male / 4	
Formulation:		50% PEG300, 30% propyleneglycol, 20% glucosteril (v/v/v)			
Duration:	[h]	168		168	
Assay:		LSC			
		% of administered dose			
Matrix	**Interval**	**Arithmetic Mean**	**SD**	**Arithmetic Mean**	**SD**
Urine	0-24 h	30.9	2.0	29.1	3.5
	0-168 h	32.5	2.1	30.4	3.7
Feces	0-24 h	47.8	5.7	55.4	5.0
	0-168 h	61.1[c]	2.7[c]	64.2	2.8
Expired air	0-48 h	0.0[c]	n.a.	n.a.	n.a.
Carcass	168 h	0.9	0.3	0.7	0.3
Cage wash	168 h	2.8	1.0	4.4	1.1
Recovery		97.3	0.8	99.7	1.8

a = mean value calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 2
b = mean value calculated from 4.2.2.5.1 R-9663 Appendix 8 Table Phase 1
c = Mean includes results calculated from data less than 30 dpm above background, n.a. = not applicable

2.6.5.14 薬物動態試験： 胆汁中排泄

2.6.5.9 (Table 9-4～Table 9-6) 参照。

2.6.5.15 薬物動態試験： 薬物相互作用

非臨床における薬物相互作用試験は実施していない。

代謝を介する薬物相互作用の可能性については2.6.5.10（Table 10-1～Table 10-18）及び2.6.5.12（Table 12-1～Table 12-10）を参照。トランスポーターを介する薬物相互作用の可能性については2.6.5.16（Table 16-1～Table 16-24）を参照。

2.6.5.16 薬物動態試験： その他

Test article: Darolutamide

Table 16-1: Pharmacokinetics: Investigation on Cell Permeability of darolutamide in Caco-2 Cells

Location: 4.2.2.7.3
Report no.: R-12064

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	Caco-2 cells		
Test compound:	Darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

	Concentration	P_{app} A-B		P_{app} B-A		Efflux ratio	Recovery A-B		Recovery B-A	
Compound	[µM]	Mean [nm/s]	SD [nm/s]	Mean [nm/s]	SD [nm/s]	Mean	Mean [%]	SD [%]	Mean [%]	SD [%]
Darolutamide	5	71.3[c]	10.0[c]	440	37.5	6.17	92.9[c]	3.47[c]	96.6	3.98
Darolutamide	30	102	8.46	346	40.8	3.38	89.5	5.84	86.9	6.46
Darolutamide	60	160	11.3	343	16.6	2.14	102	3.73	109	5.28
Darolutamide[a]	600	118	19.0	290	28.6	2.47	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Darolutamide[a]	6000	148[c]	6.97	288	22.8	1.95	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Darolutamide[b]	5	58.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	90.8	n.a.	n.a.	n.a.
Atenolol[b]	100	2.65	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	85.9	1.85	n.a.	n.a.
Minoxidil[b]	10	65.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	90.4	2.10	n.a.	n.a.

a = Darolutamide was soluble up to 60 µM. Thus, at higher test concentrations a suspension was assessed in the assay. P_{app} then was calculated with the assumption that the maximum soluble concentration of 60 µM was available in the donor compartment. At concentrations exceeding the solubility limit no recovery was calculated.

b = Separate, unidirectional experiment for direct comparison of the A-to-B permeability of daroluatmide at 5 µM with low (atenolol) and high (minoxidil) permeable reference compounds. In this experiment only the Papp A-B was assessed. Atenolol and Minoxidil controls were run in parallel with each darolutamide concentration. Values presented here were taken from the experiment run in parallel to the 5 µM concentration of darolutamide. Data was well comparable between all experiments.

c = One replicate was excluded

n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 16-2: Pharmacokinetics: Investigation on Cell Permeability of darolutamide in Caco-2 Cells

Location: 4.2.2.7.1
Report no.: R-12272

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	Caco-2 cells	Assay:	LC-MS/MS
Test compound:	Darolutamide		

Compound	Mean P_{app} A-B [10^{-6}cm/s]	Recovery A-B [%]	Mean P_{app} B-A [10^{-6}cm/s]	Recovery B-A [%]	Efflux ratio	Permeability Classification	Significant Efflux
Darolutamide	6.00	94	48.6	105	8.1	High	Yes

Test article: Darolutamide

Table 16-3: Pharmacokinetics: Investigation on Cell Permeability of darolutamide in Caco-2 Cells

Location: 4.2.2.7.2
Report no.: R-12277

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	Caco-2 cells	Assay:	LC-MS/MS
Test compound:	(*S*,*R*)-darolutamide, (*S*,*S*)-darolutamide		

Compound	Mean P_{app} A-B [10^{-6}cm/s]	Recovery A-B [%]	Mean P_{app} B-A [10^{-6}cm/s]	Recovery B-A [%]	Efflux ratio	Permeability Classification	Significant Efflux
(*S*,*R*)-darolutamide	3.19	101	40.0	102	13	High	Yes
(*S*,*S*)-darolutamide	6.45	100	37.1	103	5.8	High	Yes

Test article: Darolutamide

Table 16-4: Pharmacokinetics: In vitro studies in Caco-2 cells to evaluate the P-gp and BCRP substrate characteristics

Location: 4.2.2.7.4
Report no.: R-9662

Species: Human Study type: in vitro
Material: Caco-2 cells, CPT-B1, CPT-P1
Test compound: Darolutamide Assay: LC-MS/MS

Cell type	Test compound	Conc. [µM]	P_{app} A-B [10^{-6}cm/s]		Recovery [%]		P_{app} B-A [10^{-6}cm/s]		Recovery [%]		Efflux ratio
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Wild Type											
Caco-2	Darolutamide	0.5	0.509	0.07	64.3	3.0	39.8	7.2	72.4	5.2	78
Caco-2	Darolutamide	2	0.487	0.24	63.6	4.5	47.5	6.2	71.8	4.7	98
Caco-2	Darolutamide	10	3.25	0.79	74.3	17	44.9	2.1	77.2	10	14
BCRP											
CPT-B1	Darolutamide	2	0.992	0.25	72.5	0.89	35.4	8.2	78.8	4.8	36
P-gp											
CPT-P1	Darolutamide	2	8.51	1.6	78.0	5.8	30.5	8.3	78.0	9.0	3.6

Test article: Darolutamide

Table 16-5: Pharmacokinetics: Pharmacokinetics: In vitro studies in Caco-2 cells to evaluate the inhibitory potency towards P-gp and BCRP

Location: 4.2.2.7.4
Report no.: R-9662

Species: Human Study type: in vitro
Material: Caco-2 cells, CPT-P1
Test compound: Darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Test compound concentration [μM]	inhibitor	Inhibitor concentration [μM]	P_{app} A-B mean [10^{-6}cm/s]	Recovery [%]	P_{app} B-A mean [10^{-6}cm/s]	Recovery [%]	Efflux ratio
P-gp								
Digoxin	10	Control	0	0.629	71.7	15.9	78.2	25
Digoxin	10	Cyclosporin A	5	4.44	77.3	3.48	87.3	0.78
Digoxin	10	Darolutamide	0.247	0.578	80.3	13.4	81.2	23
Digoxin	10	Darolutamide	0.741	0.512	88.8	9.49	88.9	19
Digoxin	10	Darolutamide	2.22	0.517	80.4	12.3	92.0	24
Digoxin	10	Darolutamide	6.67	0.775	83.7	12.1	86.5	16
Digoxin	10	Darolutamide	20	0.971	80.6	11.8	88.8	12
Digoxin	10	Darolutamide	60	2.12	76.8	11.0	80.4	5.2
IC_{50}			16.4					
BCRP								
Cladribine	10	Control	0	0.667	97.9	10.1	106	15
Cladribine	10	Ko143	10	0.397	100	0.311	106	0.78
Cladribine	10	Darolutamide	0.247	0.319	106	4.33	112	14
Cladribine	10	Darolutamide	0.741[a]	0.331	96.3	5.49	103	17
Cladribine	10	Darolutamide	2.22	0.454	93.4	2.62	103	5.8
Cladribine	10	Darolutamide	6.67	0.520	101	0.947	102	1.8
Cladribine	10	Darolutamide	20	0.544	93.7	0.680	102	1.3
Cladribine	10	Darolutamide	60	0.351	93.2	0.477	96.3	1.4
IC_{50}			1.33					

a = excluded from IC_{50} calculation

Test article: Darolutamide

Table 16-6: Pharmacokinetics: In vitro studies in MDR1-MDCK cells to evaluate the P-gp substrate characteristics

Location: 4.2.2.7.5
Report no.: R-11874

Species: Human Study type: in vitro
Material: MDR1-MDCK
Test compound: Keto-darolutamide Assay: LC-MS/MS

Cell type	Test compound	Conc. [µM]	P_{app} A-B [10^{-6}cm/s] Mean	SD	Recovery [%] Mean	SD	P_{app} B-A [10^{-6}cm/s] Mean	SD	Recovery [%] Mean	SD	Efflux ratio Mean ± SD
P-gp											
MDR1-MDCK	Keto-darolutamide	1	0.801	n.d.	70.2	2.8	55.5	5.7	79.5	2.4	69.3 ± 7.1
MDR1-MDCK	Keto-darolutamide	10	2.18	0.28	67.5	6.6	55.3	3.8	68.8	1.6	25.3 ± 3.7
MDR1-MDCK	Keto-darolutamide[a]	1	15.5	3.6	48.9	1.4	17.7	3.7	64.1	2.3	1.14 ± 0.36
MDR1-MDCK	Keto-darolutamide[a]	10	17.8	6.5	58.2	3.2	21.6	3.5	68.7	4.0	1.22 ± 0.49

a = presence of 1 µM Valspodar
n.d.= not determined

Test article: Darolutamide

Table 16-7: Pharmacokinetics: In vitro studies in MDR1-MDCK cells to evaluate the inhibitory potency towards P-gp

Location: 4.2.2.7.5
Report no.: R-11874

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	MDR1-MDCK		
Test compound:	Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Substrate	Substrate concentration [μM]	Inhibitor	Inhibitor concentration [μM]	Corrected P_{app} B-A[a] [10^{-6}cm/s]	P-gp activity remaining [%]
P-gp					
Digoxin	10	Control	0	14.0	100
Digoxin	10	Keto-darolutamide	0.0412	12.9	92.3
Digoxin	10	Keto-darolutamide	0.123	11.6	83.2
Digoxin	10	Keto-darolutamide	0.370	8.65	62.0
Digoxin	10	Keto-darolutamide	1.11	9.17	65.7
Digoxin	10	Keto-darolutamide	3.33	6.92	49.6
Digoxin	10	Keto-darolutamide	10	8.30	59.5
IC_{50}			**2.57[b], 3.55[c]**		

a = Corrected P_{app} B-A = P_{app} B-A − $P_{app, valspodar}$ B-A
b = IC_{50} calculated by excluding 10 μM point
c = IC_{50} calculated by including 10 μM point

Test article: Darolutamide

Table16-8: Pharmacokinetics: In vitro studies in BCRP-MDCK cells to evaluate the BCRP substrate characteristics

Location: 4.2.2.7.6
Report no.: R-11872

Species: Human Study type: in vitro
Material: BCRP-MDCK
Test compound: Darolutamide, keto-darolutamide Assay: LC-MS/MS

Cell type	Test compound	Conc. [µM]	P_{app} A-B[10^{-6}cm/s] Mean	SD	Recovery [%] Mean	SD	P_{app} B-A [10^{-6}cm/s] Mean	SD	Recovery [%] Mean	SD	Efflux ratio Mean ± SD
BCRP											
BCRP-MDCK	Darolutamide	1	<0.238	n.a.	<81.5	n.a.	19.2	2.5	83.7	2.9	>80.6
BCRP-MDCK	Darolutamide	10	0.383	0.021	84.2	5.5	19.9	2.5	89.9	2.2	52.0 ± 7.2
BCRP-MDCK	Darolutamide[a]	1	2.03	0.22	90.2	8.0	16.6	1.8	90.0	2.8	8.16 ± 1.24
BCRP-MDCK	Darolutamide[a]	10	2.30	0.16	87.9	9.3	15.2	0.6	86.3	4.4	6.61 ± 0.53
BCRP-MDCK	Keto-darolutamide	1	3.43	0.49	92.8	5.4	46.2	10.3	95.7	7.3	13.5 ± 3.6
BCRP-MDCK	Keto-darolutamide	10	17.6	8.2	70.0	5.2	30.3	2.0	78.6	4.2	1.72 ± 0.81
BCRP-MDCK	Keto-darolutamide[a]	1	15.3	0.9	87.4	6.7	28.9	1.5	90.6	8.1	1.89 ± 0.15
BCRP-MDCK	Keto-darolutamide[a]	10	15.4	2.4	71.9	5.5	29.7	0.8	82.8	4.1	1.92 ± 0.30

a = presence of 0.5 µM Ko143
n.a. = not applicable

Test article: Darolutamide

Table 16-9: Pharmacokinetics: In vitro studies in BCRP-MDCK cells to evaluate the inhibitory potency towards BCRP

Location: 4.2.2.7.6
Report no.: R-11872

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	BCRP-MDCK		
Test compound:	Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Substrate	Substrate concentration [µM]	Inhibitor	Inhibitor concentration [µM]	Corrected P_{app} (B-A)[a] [10^{-6}cm/s]	BCRP activity remaining [%]
Cladribine	10	Keto-darolutamide	10	-0.347	-1.98
Cladribine	10	Keto-darolutamide	3.33	-0.166	-0.944
Cladribine	10	Keto-darolutamide	1.11	5.82	33.2
Cladribine	10	Keto-darolutamide	0.370	10.4	59.4
Cladribine	10	Keto-darolutamide	0.123	13.9	79.4
Cladribine	10	Keto-darolutamide	0.0412	14.6	83.0
Cladribine	10	Keto-darolutamide	0	17.5	100
IC_{50}			**0.567**		

a = corrected P_{app} B-A = P_{app} B-A - $P_{app, Ko143}$ B-A

Test article: Darolutamide

Table 16-10: Pharmacokinetics: In vitro studies to evaluate substrate characteristics towards human uptake transporters OATP1B1 and OATP1B3

Location: 4.2.2.7.7
Report no.: R-9730

Species: Human Study type: in vitro
Material: OATP1B1, OATP1B3 transfected cells
Test compound: Darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Incubation [min]	Uptake rate [pmol/mg protein/min]	Ratio
OATP1B1 transfected cells				
Darolutamide	0.5	2	22.5	1
Darolutamide	0.5	5	14.2	1
Darolutamide	0.5	10	6.95	1
Darolutamide	2	2	90.3	1
Darolutamide	2	5	53.1	1
Darolutamide	2	10	25.8	1
Darolutamide	10	2	447	1
Darolutamide	10	5	219	1
Darolutamide	10	10	103	1
Atorvastatin	0.15	5	7.39	15.5
OATP1B3 transfected cells				
Darolutamide	0.5	2	36.2	2
Darolutamide	0.5	5	12.1	1
Darolutamide	0.5	10	5.92	1
Darolutamide	2	2	79.4	1
Darolutamide	2	5	45.1	1
Darolutamide	2	10	23.7	1
Darolutamide	10	2	379	1
Darolutamide	10	5	212	1
Darolutamide	10	10	109	1
Atorvastatin	0.15	5	4.77	10.0

Test article: Darolutamide

Table 16-11: Pharmacokinetics: In vitro studies to evaluate inhibition towards human uptake transporters OATP1B1 and OATP1B3

Location: 4.2.2.7.7
Report no.: R-9730

Species: Human Study type: in vitro
Material: OATP1B1, OATP1B3 transfected HEK-cells, vector HEK-cells
Test compound: Darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Percentage inhibition
OATP1B1 transfected cells						
Darolutamide	0	Atorvastatin	0.15	5	11.3	0
Darolutamide	0.247	Atorvastatin	0.15	5	10.6	6.66
Darolutamide	0.741	Atorvastatin	0.15	5	10.1	11.4
Darolutamide	2.22	Atorvastatin	0.15	5	9.39	18.7
Darolutamide	6.66	Atorvastatin	0.15	5	8.10	30.9
Darolutamide	20	Atorvastatin	0.15	5	5.52	54.6
Darolutamide	60	Atorvastatin	0.15	5	3.34	75.8
Rifamycin SV	10	Atorvastatin	0.15	5	1.32	95.3
IC_{50}	**16.8**					
OATP1B3 transfected cells						
Darolutamide	0	Atorvastatin	0.15	5	6.42	0
Darolutamide	0.247	Atorvastatin	0.15	5	6.46	-0.92
Darolutamide	0.741	Atorvastatin	0.15	5	6.69	-5.24
Darolutamide	2.22	Atorvastatin	0.15	5	6.10	6.30
Darolutamide	6.66	Atorvastatin	0.15	5	5.64	14.4
Darolutamide	20	Atorvastatin	0.15	5	4.68	30.3
Darolutamide	60	Atorvastatin	0.15	5	2.98	61.3
Rifamycin SV	10	Atorvastatin	0.15	5	0.966	97.6
IC_{50}	**39.3**					

Test article: Darolutamide

Table 16-12: Pharmacokinetics: In vitro studies to evaluate substrate characteristics towards human uptake transporters OATP1B1 and OATP1B3

Location: 4.2.2.7.8
Report no.: R-11866

Species: Human Study type: in vitro
Material: OATP1B1, OATP1B3 transfected cells, vector-HEK cells
Test compound: Keto-darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Ratio
OATP1B1 transfected cells				
Keto-darolutamide	1	2	59.9	1.18
Keto-darolutamide	1	5	23.0	1.01
Keto-darolutamide	1	10	11.5	0.971
Keto-darolutamide	10	2	501	1.05
Keto-darolutamide	10	5	198	0.995
Keto-darolutamide	10	10	90.0	0.987
Atorvastatin	0.15	5	5.97	13.3
OATP1B3 transfected cells				
Keto-darolutamide	1	2	54.9	1.08
Keto-darolutamide	1	5	21.7	0.956
Keto-darolutamide	1	10	11.1	0.933
Keto-darolutamide	10	2	473	0.987
Keto-darolutamide	10	5	198	0.996
Keto-darolutamide	10	10	99.4	1.09
Atorvastatin	0.15	5	3.71	8.26

Test article: Darolutamide

Table 16-13: Pharmacokinetics: In vitro studies to evaluate inhibition towards human uptake transporters OATP1B1 and OATP1B3

Location: 4.2.2.7.8
Report no.: R-11866

Species: Human Study type: in vitro
Material: OATP1B1, OATP1B3 transfected HEK-cells, vector-HEK cells
Test compound: Keto-darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Percentage inhibition
OATP1B1 transfected cells						
Keto-darolutamide	0	Atorvastatin	0.15	5	5.97	0
Keto-darolutamide	1	Atorvastatin	0.15	5	5.19	14.2
Keto-darolutamide	10	Atorvastatin	0.15	5	3.73	40.8
Rifamycin SV	10	Atorvastatin	0.15	5	0.979	93.3
IC_{50}	**>10**					
OATP1B3 transfected cells						
Keto-darolutamide	0	Atorvastatin	0.15	5	3.71	0
Keto-darolutamide	1	Atorvastatin	0.15	5	3.83	-3.59
Keto-darolutamide	10	Atorvastatin	0.15	5	3.04	23.8
Rifamycin SV	10	Atorvastatin	0.15	5	0.688	97.0
IC_{50}	**>10**					

Test article: Darolutamide

Table 16-14: Pharmacokinetics: In vitro studies to evaluate inhibition towards human uptake transporters OAT1 and OAT3

Location: 4.2.2.7.13
Report no.: R-11868

Species: Human Study type: in vitro
Material: OAT1, OAT3 transfected HEK-cells, vector HEK cells
Test compound: Darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Percentage inhibition
OAT1 transfected cells						
Darolutamide	0	PAH	10	5	167	0
Darolutamide	5	PAH	10	5	233	-47.0
Darolutamide	50	PAH	10	5	176	-4.77
Probenecid	100	PAH	10	5	38.7	100
IC_{50}	**>50**					
OAT3 transfected cells						
Darolutamide	50	Furosemide	5	5	29.0	93.7
Darolutamide	16.7	Furosemide	5	5	39.0	86.4
Darolutamide	5.56	Furosemide	5	5	77.9	53.2
Darolutamide	1.85	Furosemide	5	5	117	21.0
Darolutamide	0.617	Furosemide	5	5	143	-2.29
Darolutamide	0.206	Furosemide	5	5	153	-11.3
Darolutamide	0	Furosemide	5	5	143	0
Probenecid	100	Furosemide	5	5	18.8	100
IC_{50}	**4.46**					

PAH = para-aminohippurate

Test article: Darolutamide

Table 16-15: Pharmacokinetics: In vitro studies to evaluate inhibition towards human uptake transporters OAT1 and OAT3

Location: 4.2.2.7.13
Report no.: R-11868

Species: Human Study type: in vitro
Material: OAT1, OAT3 transfected HEK-cells, vector-HEK cells
Test compound: Keto-darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Percentage inhibition
OAT1 transfected cells						
Keto-darolutamide	0	PAH	10	5	167	0
Keto-darolutamide	0.2	PAH	10	5	244	-56.1
Keto-darolutamide	2	PAH	10	5	258	-58.2
Probenecid	100	PAH	10	5	38.7	100
IC_{50}	**>2**					
OAT3 transfected cells						
Keto-darolutamide	0	Furosemide	5	5	124	0
Keto-darolutamide	0.2	Furosemide	5	5	122	-2.67
Keto-darolutamide	2	Furosemide	5	5	77.2	39.6
Probenecid	100	Furosemide	5	5	8.59	100
IC_{50}	**>2**					

PAH = para-aminohippurate

Test article: Darolutamide

Table 16-16: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the inhibitory potential towards human uptake transporter OCT2

Location: 4.2.2.7.10
Report no.: R-11870

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	OCT2 transfected HEK-cells, vector-HEK cells		
Test compound:	Darolutamide, Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Percentage inhibition
OCT2 transfected cells						
Darolutamide	0	MPP^+	5	2	720	0
Darolutamide	5	MPP^+	5	2	684	4.01
Darolutamide	50	MPP^+	5	2	761	-6.92
Imipramine	300	MPP^+	5	2	56.3	95.1
IC_{50}	**>50**					
OCT2 transfected cells						
Keto-darolutamide	0	MPP^+	5	2	720	0
Keto-darolutamide	0.2	MPP^+	5	2	711	1.32
Keto-darolutamide	2	MPP^+	5	2	741	-2.14
Imipramine	300	MPP^+	5	2	56.3	95.1
IC_{50}	**>2**					

MPP = 1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide

Test article: Darolutamide

Table 16-17: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the inhibitory potential towards MATE1

Location: 4.2.2.7.11
Report no.: R-12009

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	MATE1 transfected HEK-cells, vector-HEK cells		
Test compound:	Darolutamide / Keto-darolutamide	Assay:	LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Percentage inhibition
MATE1 transfected cells						
Darolutamide	50	Metformin	50	10	96.6	65.6
Darolutamide	16.7	Metformin	50	10	166	39.9
Darolutamide	5.56	Metformin	50	10	202	26.8
Darolutamide	1.85	Metformin	50	10	238	13.4
Darolutamide	0.617	Metformin	50	10	229	16.7
Darolutamide	0.206	Metformin	50	10	216	21.4
Darolutamide	0	Metformin	50	10	275	0
Cimetidine	100	Metformin	50	10	8.78	97.8
IC_{50}	**32.3**					
MATE1 transfected cells						
Keto-darolutamide	0	Metformin	50	10	533	0
Keto-darolutamide	1	Metformin	50	10	553	-3.77
Keto-darolutamide	10	Metformin	50	10	365	31.7
Cimetidine	100	Metformin	50	10	11.0	98.5
IC_{50}	**>10**					

Test article: Darolutamide

Table 16-18: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the inhibitory potential towards MATE2K

Location: 4.2.2.7.12
Report no.: R-11871

Species: Human Study type: in vitro
Material: MATE2K transfected HEK-cells, vector-HEK cells
Test compound: Darolutamide, keto-darolutamide Assay: LC-MS/MS

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Influx rate [pmol/mg protein/min]	Percentage inhibition
MATE2K transfected cells						
Darolutamide	50	Metformin	50	10	19.0	82.6
Darolutamide	16.7	Metformin	50	10	28.5	68.8
Darolutamide	5.56	Metformin	50	10	47.0	37.2
Darolutamide	1.85	Metformin	50	10	59.8	9.2
Darolutamide	0.617	Metformin	50	10	61.9	6.0
Darolutamide	0.206	Metformin	50	10	62.1	4.9
Darolutamide	0	Metformin	50	10	72.4	0
Pyrimethamine	1	Metformin	50	10	24.5	86.8
IC_{50}	**9.50**					
MATE2K transfected cells						
Keto-darolutamide	10	Metformin	50	10	25.0	76.2
Keto-darolutamide	5	Metformin	50	10	30.2	66.2
Keto-darolutamide	2.5	Metformin	50	10	44.3	42.2
Keto-darolutamide	1.25	Metformin	50	10	64.6	6.28
Keto-darolutamide	0.625	Metformin	50	10	67.5	-0.115
Keto-darolutamide	0.313	Metformin	50	10	84.2	-27.6
Keto-darolutamide	0	Metformin	50	10	72.4	0
Pyrimethamine	1	Metformin	50	10	12.8	95.9
IC_{50}	**2.96**					

Test article: Darolutamide

Table 16-19: Pharmacokinetics: In vitro studies to evaluate the BSEP inhibition of test articles using B-Clear®

Location: 4.2.2.7.14
Report no.: R-11099

Species:	Human			Study type:	in vitro	
Material:	Cultured Human Hepatocytes			Assay:	LC-MS/MS	
Test compound:	Darolutamide, keto-darolutamide					
Compound	**Conc. [µM]**	**Inhibitor**	**Concentration [µM]**	**Incubation [min]**	**$CL_{Biliary}$ [mL/min/kg]**	**BEI % of control**
Darolutamide						
Taurocholic acid	5	Darolutamide	0	10	3.13	100
Taurocholic acid	5	Darolutamide	0.1	10	2.81	94.9
Taurocholic acid	5	Darolutamide	0.3	10	3.31	102
Taurocholic acid	5	Darolutamide	1	10	3.29	104
Taurocholic acid	5	Darolutamide	3	10	2.86	90.2
Taurocholic acid	5	Darolutamide	10	10	3.48	99.6
Taurocholic acid	5	Darolutamide	30	10	2.91	97.1
Taurocholic acid	5	Darolutamide	60	10	3.06	100
IC_{50}			**n.a.**			
Keto-darolutamide						
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	0	10	3.57	100
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	1	10	3.96	98.2
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	3	10	4.07	100
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	10	10	3.51	98.4
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	30	10	3.67	98.9
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	60	10	2.70	80.7
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	100	10	2.33	85.0
Taurocholic acid	5	Keto-darolutamide	300	10	1.44	76.3
IC_{50}			**128**[a]			

a = A weak inhibitory effect on biliary CL of keto-darolutamide was observed. However, since the biliary excretion index remained almost unchanged with increasing test concentrations, the reduction of biliary CL cannot be attributed to inhibition of BSEP. Therefore, the IC_{50} of 128 µM likely reflects inhibition of an unidentified hepatic uptake transporter for TCA and is clinically irrelevant.

n.a. = not applicable, BEI = biliary excretion index

Test article: Darolutamide

Table 16-20: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the inhibitory potential towards hNTCP

Location: 4.2.2.7.15
Report no.: R-11918

Species:	Human		Study type:	in vitro	
Material:	NTCP transfected HEK-cells, vector-HEK cells				
Test compound:	Darolutamide, keto-darolutamide		Assay:	LSC	
Test compound	**Concentration [µM]**	**Substrate**	**Concentration [µM]**	**Incubation [min]**	**Percentage inhibition**
NTCP transfected cells					
Darolutamide	5	[^{3}H]-ES	5	1	-1.6
Darolutamide	50	[^{3}H]-ES	5	1	-0.3
Cyclosporin A	50	[^{3}H]-ES	5	1	75
NTCP transfected cells					
Keto-darolutamide	1	[^{3}H]-ES	5	1	-4.8
Keto-darolutamide	10	[^{3}H]-ES	5	1	-4.3
Cyclosporin A	50	[^{3}H]-ES	5	1	75

ES = estrone-3-sulfate

Test article: Darolutamide

Table 16-21: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the inhibitory potential towards OATP2B1

Location: 4.2.2.7.16
Report no.: R-11919

Species:	Human	Study type:	in vitro
Material:	OATP2B1 transfected HEK-cells, vector-HEK cells		
Test compound:	Darolutamide, keto-darolutamide	Assay:	LSC

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Percentage inhibition
OATP2B1 transfected cells					
Darolutamide	5	[^{3}H]-ES	2	1	8.0
Darolutamide	50	[^{3}H]-ES	2	1	34
Glibenclamide	100	[^{3}H]-ES	2	1	94
OATP2B1 transfected cells					
Keto-darolutamide	1	[^{3}H]-ES	2	1	-15
Keto-darolutamide	10	[^{3}H]-ES	2	1	-19
Glibenclamide	100	[^{3}H]-ES	2	1	94

ES = estrone-3-sulfate

Test article: Darolutamide

Table 16-22: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the inhibitory potential towards hMRP2

Location: 4.2.2.7.17
Report no.: R-11920

Species:	Human		Study type:	in vitro	
Material:	MRP2 transfected HEK-cells, vector-HEK cells				
Test compound:	Darolutamide, keto-darolutamide		Assay:	Fluorescence detection	
Test compound	**Concentration [µM]**	**Substrate**	**Concentration [µM]**	**Incubation [min]**	**Percentage inhibition**
MPR2 transfected cells					
Darolutamide	5	CDCF	5	10	4.9
Darolutamide	50	CDCF	5	10	33
Benzbromarone	100	CDCF	5	10	88
MPR2 transfected cells					
Keto-darolutamide	1	CDCF	5	10	-1.4
Keto-darolutamide	10	CDCF	5	10	13
Benzbromarone	100	CDCF	5	10	86

CDCF = 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein

Test article: Darolutamide

Table 16-23: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the inhibitory potential towards hOCT1

Location: 4.2.2.7.18
Report no.: R-11921

Species:	Human	Study type:	in vitro	
Material:	OCT1 transfected HEK-cells, vector-HEK cells			
Test compound:	Darolutamide, keto-darolutamide	Assay:	LSC	

Test compound	Concentration [µM]	Substrate	Concentration [µM]	Incubation [min]	Percentage inhibition
OCT1 transfected cells					
Darolutamide	5	[^{3}H]MPP	10	1	4.6
Darolutamide	50	[^{3}H]MPP	10	1	36
Decynium 22	50	[^{3}H]MPP	10	1	85
OCT1 transfected cells					
Keto-darolutamide	1	[^{3}H]MPP	10	1	5.0
Keto-darolutamide	10	[^{3}H]MPP	10	1	35
Decynium 22	50	[^{3}H]MPP	10	1	85

MPP = 1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide

Test article: Darolutamide

Table 16-24: Pharmacokinetics: In vitro studies to determine the substrate characteristics towards hOCT1

Location: 4.2.2.7.9
Report no.: R-12199

Species:	Human		Study type:	in vitro		
Material:	OCT1 transfected HEK-cells, vector-HEK cells					
Test compound:	[^{14}C]darolutamide, [^{14}C]keto-darolutamide		Assay:	LSC		
Test compound	**Concentration [µM]**	**Inhibitor**	**Concentration [µM]**	**Incubation [min]**	**Uptake Ratio**	**Percentage inhibition**
OCT1 transfected cells						
[^{14}C]darolutamide	1	Decynium 22	0	1	1.1	n.d.
[^{14}C]darolutamide	1	Decynium 22	50	1	0.9	n.d.
[^{14}C]darolutamide	1	Decynium 22	0	5	1.1	n.d.
[^{14}C]darolutamide	10	Decynium 22	0	1	1.0	n.d.
[^{14}C]darolutamide	10	Decynium 22	50	1	1.0	n.d.
[^{14}C]darolutamide	10	Decynium 22	0	5	1.0	n.d.
[^{3}H]MPP	10	Decynium 22	0	1	29	0
[^{3}H]MPP	10	Decynium 22	50	1	9	87
OCT1 transfected cells						
[^{14}C]keto-darolutamide	1	Decynium 22	0	1	1.2	n.d.
[^{14}C]keto-darolutamide	1	Decynium 22	50	1	1.1	n.d.
[^{14}C]keto-darolutamide	1	Decynium 22	0	5	1.2	n.d.
[^{14}C]keto-darolutamide	10	Decynium 22	0	1	1.2	n.d.
[^{14}C]keto-darolutamide	10	Decynium 22	50	1	1.2	n.d.
[^{14}C]keto-darolutamide	10	Decynium 22	0	5	1.2	n.d.
[^{3}H]MPP	10	Decynium 22	0	1	27	0
[^{3}H]MPP	10	Decynium 22	50	1	9	87

n.d = not determined
MPP = 1-Methyl-4-phenylpyridinium iodide