## 2.6.6　毒性試験の概要文の目次

2.6.6　毒性試験の概要文の目次 ..... 1
2.6.6.1　まとめ ..... 2
2.6.6.2　単回投与毒性試験 ..... 5
2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） ..... 6
2.6.6.3.1　げっ歯類における反復投与毒性 ..... 6
2.6.6.3.1.1　ラット用量設定試験 ..... 6
2.6.6.3.1.2　ラット 4 週間反復経口投与毒性試験 ..... 6
2.6.6.3.1.3　ラット 4 週間回復性評価を伴う 26 週間反復経口投与毒性試験 ..... 8
2.6.6.3.2　非げっ歯類における反復投与毒性 ..... 10
2.6.6.3.2.1　イヌ用量設定試験 ..... 10
2.6.6.3.2.2　イヌ 4 週間反復投与毒性試験 ..... 10
2.6.6.3.2.3　イヌ 4 週間回復性評価を伴う 13 週間反復経口投与毒性試験 ..... 12
2.6.6.3.2.4　イヌ 8 週間回復性評価を伴う 39 週間反復経口投与毒性試験 ..... 13
2.6.6.4　遺伝毒性試験 ..... 15
2.6.6.4.1　細菌を用いる復帰突然変異試験 ..... 15
2.6.6.4.2　*In vitro* 染色体異常試験 ..... 15
2.6.6.4.3　ラットを用いる小核試験及びコメット試験 ..... 15
2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） ..... 16
2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） ..... 16
2.6.6.7　局所刺激性試験 ..... 16
2.6.6.8　その他の毒性試験 ..... 16
2.6.6.8.1　光毒性 ..... 16
2.6.6.8.2　不純物 ..... 16
2.6.6.9　考察及び結論 ..... 17
2.6.6.10　図表 ..... 22
引用文献一覧 ..... 22

# 2.6.6　毒性試験の概要文

## 2.6.6.1　まとめ

ダロルタミドは去勢抵抗性前立腺癌の治療を目的とした新規の非ステロイド系アンドロゲン受容体（AR）シグナル伝達阻害薬であり、*in vitro* において AR に高い親和性で選択的に結合し、強力な拮抗作用を示す。ダロルタミドは薬理活性を有する 2 種類のジアステレオマーである(*S,R*)-ダロルタミド（以下、SR 体）及び(*S,S*)-ダロルタミド（以下、SS 体）の等量混合物である。これらのジアステレオマーの薬理活性に明らかな差はない。また、血中の主要代謝物であるケト-ダロルタミド（以下、M-1）も同様の薬理活性を示す。

去勢抵抗性前立腺癌では主として AR シグナル伝達経路の活性化が持続しており、通常患者には AR が高濃度で発現している。ダロルタミドによる治療は、AR シグナル伝達経路を抑制することにより、腫瘍の増殖を抑制し、疾患進行の徴候である転移の発現を遅らせると考えられる。去勢抵抗性前立腺癌患者に対して予定されている推奨用量は、ダロルタミド 600mg（300mg 錠 2 錠）を 1 日 2 回約 12 時間間隔での食後投与（1 日総量 1200mg）である。

毒性試験として反復投与毒性、遺伝毒性及び光毒性を検討した。実施した毒性試験の一覧を表 2.6.6.1- 1 及び 2.6.7.1 に示す。

毒性試験の動物種選択に際しては、ダロルタミドの薬理作用に応答し、ヒトと同じく M-1 を主な代謝物とするラット及びビーグル犬を選択した。反復投与試験では臨床投与経路が経口（錠剤内服）であることから、ラット及びイヌに反復強制経口投与した。また、吸収率により制限される曝露量を最大化するため、主要な反復投与試験（ラット 26 週間、イヌ 13 及び 39 週間反復投与試験）では 1 日 2 回投与とした。

遺伝毒性試験として、代謝活性化系存在下及び非存在下でのネズミチフス菌を用いる *in vitro* 復帰突然変異試験、及びヒトリンパ球を用いる *in vitro* 染色体異常試験を実施した。その結果、染色体異常試験（高濃度域）で陽性結果がみられたことから、ラットを用いた *in vivo* 小核試験及びコメット試験を実施した。

進行癌患者への治療を目的とすることから、ICH S9 ガイドラインに従って、がん原性試験は実施しなかった。また、前立腺癌患者は成人男性に限定されるため、生殖発生毒性試験は実施しなかった。他の AR シグナル伝達阻害薬[1, 2]で報告されているように、その作用機序から受胎能障害が現れることが明らかであることから、雄受胎能評価試験も実施しなかった。また、ダロルタミドのラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験において、雄の性腺組織の可逆性の障害が認められている。

ダロルタミドの紫外線領域における光吸収及びモル吸光係数に基づき、光毒性を評価するために *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験を実施した。

すべての重要な毒性試験は、ICH ガイドラインの S9 及び M3 に準拠し、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に関する国際的規制を遵守して実施した。

表 2.6.6.1- 1 ダロルタミドの毒性試験一覧

| Study type/ duration | Species/strain | Doses/method of administration | GLP | Location (Report number) |
|---|---|---|---|---|
| **REPEAT-DOSE TOXICITY** | | | | |
| 3-day DRF study | Rat, Wistar | 500, 1000, 2000 mg/kg/day by gavage | No | 4.2.3.2.1 (R-9726) |
| 7-day DRF study | Rat, Wistar | 1000 mg/kg/day or 500 mg/kg twice daily by gavage | No | 4.2.3.2.2 (R-9675) |
| 14-day DRF study | Rat, Wistar | 0, 50, 200, 800 mg/kg/day by gavage | No | 4.2.3.2.3 (R-9669) |
| 28-day study | Rat, Wistar | 0, 100, 300, 1000 mg/kg/day by gavage | Yes | 4.2.3.2.4 (R-9668) |
| 26-week study with 4-week recovery | Rat, Wistar | 0, 50, 150, 500 mg/kg twice daily by gavage | Yes | 4.2.3.2.5 (R-9678) |
| DRF + 7-day fixed dose study | Dog, Beagle | DRF: 0+50+200+400 +800+1000 mg/kg/day, 7-day: 1000 mg/kg/day by gavage | No | 4.2.3.2.6 (R-9670) |
| DRF + 14-day fixed dose study | Dog, Beagle | DRF: 200+400+800+1000 mg/kg/day, 14-day: 0, 200, 400 mg/kg twice daily by gavage | No | 4.2.3.2.7 (R-11057) |
| 28-day study | Dog, Beagle | 0, 50, 200, 800 mg/kg/day by gavage | Yes | 4.2.3.2.8 (R-9667) |
| 13-week study with 4-week recovery | Dog, Beagle | 0, 25, 75, 200 mg/kg twice daily by gavage | Yes | 4.2.3.2.9 (R-9672) |
| 39-week study with 8-week recovery | Dog, Beagle | 0, 25, 75, 200 mg/kg twice daily by gavage | Yes | 4.2.3.2.10 (R-9679) |
| **GENOTOXICITY STUDIES** | | | | |
| Ames test | *Salmonella Typhimurium* | *in vitro* 3 to 5000 μg/plate | Yes | 4.2.3.3.1.1 (R-9724) |
| CA *in vitro* | Human lymphocytes | *in vitro* up to 400 μg/mL | Yes | 4.2.3.3.1.2 (R-9725) |
| *In vivo* rat micronucleus and Comet study | Rat, Wistar | 0, 100, 500, 1000 mg/kg/day for three days by gavage | Yes | 4.2.3.3.2.1 (R-9674) |
| **PHOTOTOXICITY STUDIES** | | | | |
| *In vitro* 3T3 neutral red uptake photo-toxicity assay | Balb/c 3T3 mouse fibroblasts | *in vitro* 1.78, 3.16, 5.62, 10.0, 17.8, 31.6, 56.2 and 100 μg/mL | Yes | 4.2.3.7.7.1 (R-9671) |

DRF = Dose range finding; CA = Chromosome aberration

毒性プロファイルは以下のように要約される。

ラットに最高 1000mg/kg/日（500mg/kg×2）を 26 週間、イヌに最高 800mg/kg/日を 4 週間及び最大 400mg/kg/日（200mg/kg×2）を 39 週間反復経口投与したところ、良好な忍容性を示した。これらの試験では、体重増加量の減少（軽度）、摂餌量の減少、前立腺及び精巣上体重量の減少、前立腺及び精嚢における分泌の減少／萎縮、精巣上体における上皮の萎縮／管径の縮小／精子減少症、並びに精巣重量の軽度減少（ラットのみ）がみられ、これらすべての所見はダロルタミドの抗アンドロゲン作用又は抗同化作用に関連したものであると考えられた（毒性所見とは判断しなかった）。ラット及びイヌで認められた雄性生殖器系の変化は、4 あるいは 8 週間の休薬期間終了時には完全な回復あるいは回復傾向を示した。

雄ラットに長期反復投与後に、軽微から軽度の乳腺萎縮がすべての投薬群に、また下垂体前葉における空胞形成の軽微な増加が各投薬群の数例で認められたが、これらはホルモンの不均衡を反映したものと推測された。

いずれの試験においても、オフターゲットの毒性は認められなかった。また、雌ラット及び雌イヌに注目すべき影響は認められなかった。

ラット及びイヌにおいてダロルタミドの曝露量は用量比例性を下回る増加を示し、イヌでは 400（200×2）mg/kg/日の反復投与で吸収の飽和がみられた。血漿中での蓄積性は認められなかった。

ダロルタミドの細菌を用いる復帰突然変異試験を実施したところ、変異原性は認められなかった。一方、培養ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験では、200μg/mL 以上の高濃度で染色体構造異常が誘発された。この陽性結果を受けて、ラットを用いる *in vivo* 小核試験及びコメット試験（1000mg/kg/日までを 3 日間反復経口投与）を追加実施した。骨髄における小核を有する細胞数、並びに肝臓及び十二指腸における DNA 損傷の程度は、対照群及び背景値と同等であった。このときの全身曝露量は、男性患者にダロルタミドの 600mg を 1 日 2 回経口投与したときの全身曝露量を十分に上回っていた（1000mg/kg/日投与時で AUC 比 5.4 倍）。これら *in vivo* 試験の結果から、ダロルタミドはヒトに対して遺伝毒性のリスクはないと考えられた。

*In vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験の結果から、ダロルタミドに光毒性はないことが示された。

## 2.6.6.2　単回投与毒性試験

ダロルタミドの独立した単回投与毒性試験は実施しなかった。ラット及びイヌを用いた短期反復投与による用量設定試験において、ラットで 2000mg/kg まで、イヌで 1000mg/kg までの用量を 3 又は 7 日間反復経口投与したところ、毒性所見は認められなかった（2.6.6.3.1.1 及び 2.6.6.3.2.1）。

雄ラットの試験では、2000mg/kg/日までの用量を 3 日間反復経口投与したところ、良好な忍容性が認められた。2000mg/kg 群では初回投与日のみの一過性でわずかな体重増加量の減少がみられたが、死亡及び一般症状の発現は認められなかった（4.2.3.2.1 及び 2.6.7.6　R-9726）。

雄ビーグル犬を用いた用量漸増試験において、最高 1000mg/kg/日を 3 及び 7 日間反復経口投与した（4.2.3.2.6 及び 2.6.7.6 R-9670）。また、雌ビーグル犬を用いた短期反復経口投与による用量設定試験において、最高 1000mg/kg/日を 3 日間反復経口投与した（4.2.3.2.7 及び 2.6.7.6 R-11057）。その結果、いずれの用量においても毒性所見は認められなかった。一般症状観察で白色チョーク様便がみられたが、吸収されずに排泄された被験物質であると考えられた。

以上の成績から、ダロルタミド単回経口投与時の概略の致死量は、ラット（雄）で 2000mg/kg より大きく、イヌ（雌雄）で 1000mg/kg より大きいと考えられた。

## 2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

### 2.6.6.3.1　げっ歯類における反復投与毒性

#### 2.6.6.3.1.1　ラット用量設定試験

参照項目 4.2.3.2.1　R-9726（参）
4.2.3.2.2　R-9675（参）
4.2.3.2.3　R-9669（参）

雄ラットを用いた強制経口投与による用量設定試験では 0.5%メチルセルロースを媒体として限度用量である 2000mg/kg までの用量を 3 日間反復投与したところ、その忍容性は良好であった。高用量 2000mg/kg 群で軽度一過性の体重増加量の減少及び薬理作用と考えられる精嚢の小型化がみられたが、一般症状の発現や死亡例の出現は認められなかった（2.6.7.6　R-9726）。続いて実施した雌雄ラットの 7 日間反復経口投与による用量設定試験では、異なるバッチのダロルタミドを用いて 1000mg/kg を 7 日間反復投与して臨床的な忍容性及びトキシコキネティクスを検討したところ、毒性所見は認められなかった（2.6.7.6　R-9675）。更に、50、200 及び 800mg/kg の各用量を雌雄ラットに 14 日間反復経口投与する用量設定試験を実施した。その結果、最高用量 800mg/kg までその忍容性は良好であり、低用量 50mg/kg から薬理学的活性を示唆する所見、すなわち、前立腺及び精巣上体の重量減少、精嚢での分泌減少及び雄乳腺の雌表現型への変化がみられた（2.6.7.6　R-9669）。

#### 2.6.6.3.1.2　ラット 4 週間反復経口投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.4　R-9668

各群雌雄各 10 例の Wistar 系ラットにダロルタミドの 0、100、300 及び 1000mg/kg/日を 28 日間強制経口投与した。性成熟したラット（投与開始時：約 7～8 週齢）を用いて、媒体として 0.5%（w/v）メチルセルロース／0.5%（v/v）Tween 80 水溶液にダロルタミドを懸濁して投与液とした。投与量は一般的なラット短期反復投与時の最大耐量（MTD）及び予定臨床用量を考慮し、14 日間反復投与による用量設定試験の結果（2.6.6.3.1.1 R-9669）を基に設定した。

ダロルタミド投与の影響は、生死、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、臨床病理学検査（血液検査及び尿検査）、並びに病理学的検査（剖検、臓器重量及び病理組織学的検査）より評価した。投与 3～6 時間後の詳細な機能観察総合評価（FOB）を毎週 1 回実施した。トキシコキネティクス検討用の血液を投与初日及び 28 日目に採取した。

試験成績を 2.6.7.7.1 に示す。

ダロルタミド反復投与の忍容性は良好であり、試験期間中に死亡はみられなかった。一般症状観察では、投与最終週の 1000mg/kg/日群の雌雄数例に流涎過多（投与前及び投与直後）が観察された。また、100mg/kg/日以上の雄に摂餌量の減少傾向を伴う体重増加量の減少（用量依存性）がみられたが、雌に影響はみられなかった。雌雄ともに摂水量に影響はみられなかった。

第 3 週目に雌雄 300mg/kg 以上の群において FOB 検査で運動性の軽度低下がみられたが、一般症状観察で認められない程度の軽度の変化であったことから、毒性所見とは考えなかった。

眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固能検査及び尿検査各項目に被験薬投与に関連した影響は認められなかった。

前立腺及び精巣上体重量の減少並びに胸腺重量の増加が 100mg/kg/日以上の雄で認められた。病理組織学的検査では、前立腺における軽微～中等度の分泌減少及び胸腺の退縮遅延と考えられ

る所見（皮質リンパ球減少・消失の発現頻度減少）が 100mg/kg/日以上の群でみられた。対照群と比較して、精巣上体の小型化が 100mg/kg/日以上の群にみられたが、病理組織学的検査でその形態及び精巣上体管内の精子は対照群と同様であった。また、精嚢における軽微～重度の分泌減少が 100mg/kg/日以上の雄でみられた。なお、精巣及び精巣上体の片側小型化が 1000mg/kg 群 1 例にみられたが、組織学的に異常所見は認められず、偶発所見と考えられた。

抗アンドロゲン薬に典型的な性腺への薬理作用は低用量の 100mg/kg/日から認められた。体重増加量及び摂餌量の減少は、雄で認められたが雌では認められず、ダロルタミドは同化作用を有するアンドロゲンを抑制することから、ダロルタミドの抗同化作用に関連したものと考えられた。高用量 1000mg/kg/日の忍容性は良好であり、いずれの所見も作用機序に関連したものであった。また、対照群と比べた最終平均体重に有意な減少は認められず、毒性所見とは判断しなかった。

表 2.6.6.3- 1　ラット 4 週間反復投与毒性試験 R-9668 における主要な所見

| Species No./group | Darolutamide dose level (mg/kg/day) | Findings | Darolutamide $AUC_{(0-24)}$ (h･ng/mL) | M-1 $AUC_{(0-24)}$ (h･ng/mL) |
|---|---|---|---|---|
| Rat, Wistar 10 M + 10 F | 100 | Prostate: weight ↓ (-63%)<br>Epididymides: weight ↓ (-27%)<br>Prostate & seminal vesicles: reduced secretion<br>Thymus: weight ↑ (M) (+38%), inhibition of lymphocyte depletion consistent with natural involution (M) | 88100 (M) [x1.5] 160000 (F) | 104000 (M) [x0.8] 144000 (F) |
| | 300 | Prostate: weight ↓ (-65%)<br>Epididymides: weight ↓ (-32%)<br>Prostate & seminal vesicles: reduced secretion<br>Thymus: weight ↑ (M) (+33%), inhibition of lymphocyte depletion consistent with natural involution (M) | 147000 (M) [x2.6] 216000 (F) | 198000 (M) [x1.5] 209000 (F) |
| | 1000 | Prostate: weight ↓ (-62%)<br>Epididymides: weight ↓ (-28%)<br>Prostate & seminal vesicles: reduced secretion<br>Thymus: weight ↑ (M) (+31%), inhibition of lymphocyte depletion consistent with natural involution (M) | 207000 (M) [x3.6] 242000 (F) | 277000 (M) [x2.1] 248000 (F) |

[ ]: MoE (margin of exposure) when compared to exposure in male subjects after treatment of twice daily of 600 mg of darolutamide at steady state (extracted from Module 2.6.7.3).

## 2.6.6.3.1.3　ラット 4 週間回復性評価を伴う 26 週間反復経口投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.5　R-9678

各群雌雄各 10 例の Wistar 系ラット（投与開始時：約 8 週齢）にダロルタミドの 0、100（50×2）、300（150×2）及び 1000（500×2）mg/kg/日を、8 時間の投与間隔で 1 日 2 回、26 週間反復経口投与した。更に、対照群及び最高用量群には各群雌雄各 5 例の回復群を設定し、4 週間休薬後の所見の回復性を評価した。ダロルタミドの全身曝露を増加させるため、1 日 2 回投与とした。媒体として 0.5%（w/v）メチルセルロース／0.5%（v/v）Tween 80 水溶液を用いてダロルタミドを懸濁して投与液とした。ラット 7 日間投与試験（2.6.6.3.1.1 R-9675）において、500mg/kg の 1 日 2 回投与は 1000mg/kg の 1 日 1 回投与時より高曝露が得られたことから、1 日 2 回の投与法を採択した。また、1000mg/kg の 1 日 1 回 4 週間反復投与時の忍容性は良好（2.6.6.3.1.2）で、ラット長期反復投与時の最大用量として許容できることから高用量として 1000（500×2）mg/kg を設定した。低用量 100（50×2）mg/kg はラットにおいて薬効用量であり、ヒトに薬理作用を惹起する十分量と考えられたことから、また、中間用量 300（150×2）mg/kg は高用量と低用量の幾何平均として設定した。ダロルタミド投与の影響は、生死、一般症状、体重、摂餌量及び摂水量、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液検査及び尿検査）、並びに病理学的検査（剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査）より評価した。トキシコキネティクス検討用の血液を初回投与後、並びに投与 13 及び 26 週目に採取した。

本試験で認められた主な所見を表 2.6.6.3- 2 に、試験成績の詳細を 2.6.7.7.2 に示す。

ダロルタミドの忍容性は良好であった。雄の全ての被験薬投与群で摂餌量の減少傾向を伴う体重増加量の軽度減少（1000mg/kg/日群で投与期間終了時対照群と比較して、－3%）がみられたが、最終体重には対照群に比して有意な影響は認められず軽微な変化であったことから、毒性学的意義は低いと考えられた。

意義のある所見は雄の性腺に対する影響のみであった。対照群と比較して、前立腺、精巣上体及び精巣重量の統計学的に有意な減少がすべての被験薬投与群にみられた（表 2.6.6.3- 2）。これら変化の程度はすべての被験薬投与群で同様であった。病理組織学的検査では、前立腺及び精嚢の中等度から重度の萎縮が認められた。萎縮の特徴として、上皮の菲薄化、分泌の減少及び前立腺間質の緻密化がみられた。精巣上体管径の軽度縮小がすべての被験薬投与群で認められ、精巣上体重量の減少及び数例の小型化がみられた。これは精子産生の減少を反映したものと考えられる。しかしながら、すべてのステージの精子が存在し、精細管には巨精子細胞などの異常細胞は認められず、また、精巣上体に脱落細胞も観察されなかったことから、定性的に精子産生は正常に維持されていると考えられた。

軽微から軽度の乳腺萎縮が、すべての被験薬投与群の雄（低用量群から順に、7/10、5/10 及び 6/9 例）でみられた。更に、下垂体前葉における空胞形成の軽微な増加が雄の各投薬群で 1～2 例（低用量群から順に、1/10、1/10 及び 2/10 例）に認められたが、ホルモンによるフィードバックを反映したものと推測された。また、変性性変化や炎症を伴わず、休薬により完全に回復する変化であったことから毒性所見とは考えなかった。

いずれの変化も想定される作用機序に関連したものであり、可逆性変化であると考えられた。また、雌に影響は認められなかった。

表 2.6.6.3- 2 ラットを用いた 26 週間反復経口投与試験 R-9678 の主要な所見

| Species No./group | Darolutamide (dose level (mg/kg/day) | Findings | Darolutamide $AUC_{(0-24)}$ (h・ng/mL) | M-1 $AUC_{(0-24)}$ (h・ng/mL) |
|---|---|---|---|---|
| Rat Wistar 10 M + 10 F, 5 M + 5 F for recovery (control & high dose) | 100 (50 × 2) | Prostate: weight ↓ (-61%)<br>Testes: weight ↓ (-15%)<br>Prostate & seminal vesicles: atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-32%), decrease in tubular diameter<br>Pituitary gland: minimal increase in vacuolation of pars anterior (1/10 M)<br>Mammary gland: minimal/slight atrophy (7/10 M) | 66800 (M) [x1.2] 132000 (F) | 73200 (M) [x0.6] 106000 (F) |
| | 300 (150 × 2) | Prostate: weight ↓ (-74%)<br>Testes: weight ↓ (-16%)<br>Prostate & seminal vesicles: atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-38%), decrease in tubular diameter<br>Pituitary gland: minimal increase in vacuolation of pars anterior (1/10 M)<br>Mammary gland: minimal/slight atrophy (5/10 M) | 105000 (M) [x1.8] 193000 (F) | 114000 (M) [x0.9] 146000 (F) |
| | 1000 (500 × 2) | Prostate: weight ↓ (-76%)<br>Testes: weight ↓ (-17%)<br>Prostate & seminal vesicles: atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-42%), decrease in tubular diameter<br>Pituitary gland: minimal increase in vacuolation of pars anterior (2/10 M)<br>Mammary gland: minimal/slight atrophy (6/9 M) | 135000 (M) [x2.3] 292000 (F) | 139000 (M) [x1.1] 253000 (F) |

[ ]: MoE (margin of exposure) when compared to exposure in male subjects after treatment of twice daily of 600 mg of darolutamide at steady state (extracted from Module 2.6.7.3).

## 2.6.6.3.2　非げっ歯類における反復投与毒性

### 2.6.6.3.2.1　イヌ用量設定試験

参照項目：4.2.3.2.6　R-9670（参）
4.2.3.2.7　R-11057（参）

最初の用量漸増試験では、2 例の雄性ビーグル犬に（Part A として）50、200、400、800 及び 1000mg/kg を 1 日 1 回 3 日間反復経口投与（各用量間に 3～4 日間ずつの wash-out 期間を設置）し、別の 2 例の雄に（Part B として）1000mg/kg を 7 日間反復経口投与した。その結果、用量制限毒性は観察されなかった。また、800mg/kg 投与後と 1000mg/kg 投与後の全身曝露量に明らかな増加が認められなかったことから、800mg/kg/日で吸収の飽和がみられたことが示唆された。更に、Part B の一般症状観察にて認められた白色チョーク様便は吸収されなかった被験物質と考えられた（2.6.7.6　R-9670）。したがって、4 週間反復投与試験（2.6.6.3.2.2）では 800mg/kg/日を最高用量に設定した。続いて実施した短期反復経口投与による用量設定試験では、各群 2 例の雌性ビーグル犬に 200 又は 400mg/kg の用量を 1 日 2 回（800mg/kg/日）又は 200～1000mg/kg を 1 日 1 回 3 日間経口投与した。更に別の 2 例の雌イヌに 200 又は 400mg/kg を 1 日 2 回の頻度（400 又は 800mg/kg/日）で 14 日間反復投与した。また、別の 2 例の雄イヌに、200 又は 400mg/kg を 1 日 1 回 3 日間反復経口投与した。その結果、先の試験同様に白色便がみられたが、いずれの投与量でも用量制限毒性は認められず、200mg/kg を 1 日 2 回投与及び 400mg/kg を 1 日 1 回投与を超える投与量では全身曝露の更なる増加は認められなかった（2.6.7.6　R-11057）。すなわち、400mg/kg/日の反復投与で吸収の飽和が認められた。

### 2.6.6.3.2.2　イヌ 4 週間反復投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.8　R-9667

ビーグル犬（投与開始時：13～14 ヵ月齢）にダロルタミドを 4 週間反復経口投与した。媒体として 0.5%（w/v）メチルセルロース／0.5%（v/v）Tween 80 溶液を用いてダロルタミドを懸濁した。イヌ単回投与後の薬物動態データから、給餌後投与でダロルタミド及びその代謝物 M-1 の曝露が高かったこと（2.6.4.3.1 イヌ単回投与後の薬物動態　参照）から、本試験では給餌 30 分後に投与した。

各群 4 例の雄性ビーグル犬にダロルタミドの 0（溶媒）、50、200 及び 800mg/kg/日を 1 日 1 回反復経口投与した。投与量は一般的なイヌ短期反復投与時の MTD、曝露量及び予定臨床用量を考量し、用量漸増 7 日間投与試験の結果（2.6.6.3.2.1 R-9670）に基づいて設定した。ダロルタミド投与の影響は、生死、一般症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血圧、臨床病理学検査（血液検査及び尿検査）、並びに病理学的検査（剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査）より評価した。トキシコキネティクス評価用の血液を投与初日及び 28 日目の投与後に採取した。

観察された主要な所見を表 2.6.6.3- 3 に、その詳細を 2.6.7.7.3 に示す。

その結果、ダロルタミドの忍容性は良好であった。唯一認められた一般状態への影響は、すべての被験薬投与群でみられた体重の軽度減少（用量依存性）であり、試験期間全体における体重変化量は 50、200 及び 800mg/kg/日群でそれぞれ－2、－3 及び－6%（cf. 対照群＋2%）であった（最終平均体重には有意差なし）。200mg/kg/日以上の群では摂餌量の減少傾向もみられた。

前立腺重量の重度減少（約－80%）がすべての被験薬投与群でみられたが、用量依存性は認められなかった（表 2.6.6.3- 3）。病理組織学的検査では、前立腺の中等度のびまん性萎縮がすべての被験薬投与群でみられた（50mg/kg/日群の 1 例のみ軽微）。また、精巣上体重量の減少がすべての被験薬投与群で認められた。精巣上体における軽微から軽度の精子減少症が 50mg/kg/

日群の 2/4 例、200mg/kg/日群の 2/4 例及び 800mg/kg/日群の 4 例全例に、軽微から軽度の精巣上体上皮空胞化が 50mg/kg/日群の 2/4 例、並びに 200 及び 800mg/kg/日群の 4 例全例にみられた。

**表 2.6.6.3- 3　イヌを用いた 4 週間反復経口投与試験 R-9667 の主要な所見**

| Species No./group | Darolutamide dose level (mg/kg/day) | Findings | Darolutamide $AUC_{(0-24)}$ (h･ng/mL) | M-1 $AUC_{(0-24)}$ (h･ng/mL) |
|---|---|---|---|---|
| Dog, Beagle 4 M | 50 | Prostate: weight ↓ (-78%), atrophy, Epididymis: weight ↓ (-24%), oligospermia and vacuolation of epithelium | 71000 [x1.2] | 51200 [x0.4] |
| | 200 | Prostate: weight ↓ (-82%), atrophy, Epididymides: weight ↓ (-36%), oligospermia and vacuolation of epithelium | 157000 [x2.7] | 104000 [x0.8] |
| | 800 | Prostate weight ↓ (-79%), atrophy, Epididymides: weight ↓ (-32%), oligospermia and vacuolation of epithelium | 162000 [x2.8] | 107000 [x0.8] |

[ ]: MoE (margin of exposure) when compared to exposure in male subjects after treatment of twice daily of 600 mg of darolutamide at steady state (extracted from Module 2.6.7.3).

認められたすべての所見はダロルタミドの抗アンドロゲン作用に関連したものと考えられた。アンドロゲンは同化作用を有することが知られていることから、体重及び摂餌量の軽度減少／減少傾向もダロルタミドの抗同化作用に関連したものと考えられた。

## 2.6.6.3.2.3 イヌ 4 週間回復性評価を伴う 13 週間反復経口投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.9 R-9672

各群雌雄各 4 例のビーグル犬にダロルタミドの 0（溶媒）、50（25×2）、150（75×2）及び 400（200×2）mg/kg/日（投与間隔 8 時間の 1 日 2 回投与）を 13 週間反復経口投与した。全身曝露量を増加させるため 1 日 2 回投与を選択した。先のイヌ 4 週間反復投与試験（2.6.6.3.2.2）において、200 及び 800mg/kg/日を投与したところ、これらの用量間で曝露の増加がみられなかったことから、本試験では最高用量として 400（200×2）mg/kg/日を選択した。更に、対照群及び最高用量群には各群雌雄各 2 例を追加し、4 週間休薬後の所見の回復性を評価した。本薬投与の影響は、生死、一般症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血圧、臨床病理学検査（血液検査及び尿検査）、並びに病理学的検査（剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査）より評価した。トキシコキネティクス検討用の血液を投与初日及び 89 日目の投与後に採取した。

本試験で認められた主な所見を表 2.6.6.3- 4 に、その詳細を 2.6.7.7.4 に示す。

400（200×2）mg/kg/日群では散発的に白色便がみられたが、吸収されなかったダロルタミドが糞便中に排泄されたものと考えられた。対照群と比較して統計学的に有意ではなかったものの、体重の軽度減少傾向（－1.5%）が雌の 400（200×2）mg/kg/日群にみられた。

対照群と比較して、前立腺重量の重度減少（約－60%～－70%）がすべての被験薬投与群でみられ、これに関連した所見として、重度の前立腺萎縮が認められた（表 2.6.6.3- 4）。対照群と比較して、精巣上体重量の減少もすべての被験薬投与群で認められた。関連した組織学的検査所見として、精巣上体管径の減少及び精巣上体上皮の空胞化を伴う萎縮がすべての被験薬投与群でみられた。これら所見の程度は低及び中用量群では同程度、高用量群ではわずかに強かった。なお、雄 400（200×2）群に腎臓相対重量の減少がみられたが、病理組織学的に異常所見は認められなかったことから、その毒性学的意義は低いと考えられた。

**表 2.6.6.3- 4 イヌを用いた 13 週間反復投与試験 R-9672 の主要な所見**

| Species No./group | Darolutamide dose level (mg/kg/day) | Findings | Darolutamide $AUC_{(0-24)}$ (h·ng/mL) | M-1 $AUC_{(0-24)}$ (h·ng/mL) |
|---|---|---|---|---|
| Dog, Beagle, 4 M + 4 F, 2 M + 2 F for recovery, (control & high dose) | 50 (25 × 2) | Prostate: weight ↓ (-67%), atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-33%), decreased tubular diameter, epithelial atrophy | 85800 (M) [x1.5] 92400 (F) | 80300 (M) [x0.6] 67800 (F) |
| | 150 (75 × 2) | Prostate: weight ↓ (-62%), atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-11%), decreased tubular diameter, epithelial atrophy | 115000 (M) [x2.0] 120000 (F) | 79400 (M) [x0.6] 123000 (F) |
| | 400 (200 × 2) | Prostate: weight ↓ (-71%), atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-36%), decreased tubular diameter, epithelial atrophy | 116000 (M) [x2.0] 166000 (F) | 96300 (M) [x0.7] 123000 (F) |

[ ]: MoE (margin of exposure) when compared to exposure in male subjects after treatment of twice daily of 600 mg of darolutamide at steady state (extracted from Module 2.6.7.3).

4 週間の休薬期間終了時（400mg/kg/日群）には、前立腺の軽微な萎縮のみが認められ（投与終了時には 4 例全例で重度な変化）、回復性が認められた。また、前立腺重量にも回復傾向がみ

られた。精巣上体における変化も軽微（上皮委縮及び管径縮小）のみであり（投与終了時には軽度から重度までの変化）、これらの所見はすべて回復するものと考えられた。

### 2.6.6.3.2.4　イヌ 8 週間回復性評価を伴う 39 週間反復経口投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.10　R-9679

ビーグル犬（各群雌雄各 4 例）にダロルタミドの 0（溶媒）、50（25×2）、150（75×2）及び 400（200×2）mg/kg/日（投与間隔 8 時間の 1 日 2 回投与）を 39 週間反復経口投与した。更に、対照群及び最高用量群には各群雌雄各 2 例を追加し、8 週間休薬後に所見の回復性を評価した。投与量は一般的なイヌ長期反復投与時の MTD、曝露量及び予定臨床用量を考慮し、先の 13 週間反復投与試験の結果（2.6.6.3.2.3）を基に設定した。ダロルタミド投与の影響は、生死、一般症状、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血圧、臨床病理学検査（血液検査及び尿検査）、並びに病理学的検査（剖検所見、臓器重量及び病理組織学的検査）より評価した。トキシコキネティクス検討用の採血を投与初日、13 及び 39 週の投与後に実施した。

本試験で認められた主な所見を表 2.6.6.3- 5 に、その詳細を 2.6.7.7.5 に示す。

投薬期間中に、すべての雄の被験薬投与群で体重増加量の軽度減少（変化量としてそれぞれ＋5.5%、＋1.7%及び＋6.6%、対照群で＋15%）がみられたが、対照群と比較した場合の増加量に用量依存性はなく、最終平均体重としても用量依存性を伴う統計学的に有意な変化はなかった。400（200×2）mg/kg/日群の雌 1 例で投与過誤があったことから、投与 88 日に屠殺した。

血液学的検査では、赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及び赤血球容積）の減少が主に 150（75×2）及び 400（200×2）mg/kg/日群の雄で、投与 13～39 週にみられた。しかしながら、これらの変化は軽度であり、個別値でみた場合にはすべての値が背景値の範囲内あるいはその付近にあった。

対照群と比較して、前立腺重量の統計学的に有意な減少（約－80%）がすべての被験薬投与群でみられており、関連した所見として重度の前立腺萎縮が認められた。対照群と比較して、精巣上体重量の統計学的に有意な減少（約－30%）もすべての被験薬投与群でみられており、関連した所見として精子の減少、精巣上体管径の縮小及び上皮の萎縮がすべての雄投薬群でみられた。対照群と比較して、精巣重量の増加（最大＋23%）がすべての被験薬投与群でみられ、関連する所見として、軽微から軽度の精細管管腔拡張及び精細管の変性／萎縮が 400（200×2）mg/kg/日群の 4 例すべてにみられた。これらの内 2 例では、肉芽腫性炎症を伴う軽微から軽度の精細管内精子貯留も認められた。軽微な精細管拡張は 50（25×2）mg/kg/日群の 1 例でも、また、軽微な精子貯留は 150（75×2）mg/kg/日群の 1 例でもみられた。8 週間の休薬期間終了時にすべての所見は回復あるいは明らかな回復傾向が認められた。雌では被験薬投与に関連した影響は認められなかった。なお、全ての被験薬投与雄動物に脾臓絶対重量の減少がみられたが、対応する組織学的変化は認められず、毒性学的意義は低いと考えられた。

表 2.6.6.3- 5 イヌを用いた 39 週間反復経口投与試験 R-9679 の主要な所見

| Species No./group | Darolutamide dose level (mg/kg/day) | Findings | Darolutamide $AUC_{(0-24)}$ (h･ng/mL) | M-1 $AUC_{(0-24)}$ (h･ng/mL) |
|---|---|---|---|---|
| Dog, Beagle, 4 M + 4 F, 2 M + 2 F for recovery, (control & high dose) | 50 (25 × 2) | Prostate: weight ↓ (-79%), atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-31%), decreased tubular diameter, epithelial atrophy and reduced sperm content<br>Testes: weight ↑ (+10%), minimal tubular dilatation (1/4 M) | 96700 (M) [x1.7] 78100 (F) | 72600 (M) [x0.6] 58400 (F) |
| | 150 (75 × 2) | Prostate: weight ↓ (-80%), atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-26%), decreased tubular diameter, epithelial atrophy and reduced sperm content<br>Testes: weight ↑ (+16%), sperm accumulation (1/4 M) | 103000 (M) [x1.8] 145000 (F) | 75200 (M) [x0.6] 135000 (F) |
| | 400 (200 × 2) | Prostate: weight ↓ (-83%), atrophy<br>Epididymides: weight ↓ (-30%), decreased tubular diameter, epithelial atrophy and reduced sperm content<br>Testes: weight ↑ (+23%), tubular luminal dilatation and tubular degeneration/atrophy (4/4 M), tubular luminal sperm accumulation with granulomatous inflammation (2/4 M) | 206000 (M) [x3.6] 217000 (F) | 152000 (M) [x1.2] 166000 (F) |

[ ]: MoE (margin of exposure) when compared to exposure in male subjects after treatment of twice daily of 600 mg of darolutamide at steady state (extracted from Module 2.6.7.3).

## 2.6.6.4　遺伝毒性試験

### 2.6.6.4.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

参照項目：4.2.3.3.1.1　R-9742

5 種類のネズミチフス菌株を用いてダロルタミドの 5000μg/プレートまでの濃度で突然変異誘発性を検討した。代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在及び非存在下で独立した 2 試験を実施した。細胞毒性及びダロルタミドの沈殿が 2500～5000μg/プレートの濃度で認められた。本試験の結果、復帰変異コロニー数の増加は認められず、突然変異誘発性は認められなかった。試験成績の詳細を 2.6.7.8.1 に示す。

### 2.6.6.4.2　*In vitro* 染色体異常試験

参照項目：4.2.3.3.1.2　R-9725

培養ヒト末梢血リンパ球を用いて、ダロルタミドが細胞毒性を示す濃度あるいは沈殿が生じる濃度（400μg/mL＝1mM）までの染色体異常誘発性を検討した。代謝活性化系（ラット肝 S9 mix）の存在及び非存在下で独立した 5 試験を実施した。代謝活性化系の非存在下の 200μg/mL 以上及び存在下の 240μg/mL 以上の濃度でダロルタミドは溶媒対照と比較して、染色体構造異常の発現頻度を増加させた。染色体異常の誘発は細胞毒性を示さない濃度においてもみられ、その発現頻度は試験実施施設における背景データを上回った。このように、本 *in vitro* 試験でダロルタミドは遺伝毒性陽性であった。試験成績の詳細を 2.6.7.8.2 に示す。

### 2.6.6.4.3　ラットを用いる小核試験及びコメット試験

参照項目：4.2.3.3.2.1　R-9674

各群 6 例の雄性 Wistar 系ラットにダロルタミドの 100、500 及び 1000mg/kg（投与可能な最大投与量）を 1 日 1 回、3 日間連続経口投与し、骨髄の多染性赤血球（PCE）における小核誘発性及びコメット試験による肝臓及び十二指腸における DNA 損傷誘発性について検討した。

すべての被験物質投与群では、PCE 割合（%）の平均値が対照群及び試験実施施設における背景データと同程度であったことから、ダロルタミドは骨髄毒性を誘発しないと考えられた。また、各被験薬群における小核を有する多染性赤血球（mnPCE）の割合の平均値は、いずれも対照群と同様の範囲にあり、ダロルタミドに小核誘発能は認められなかった（2.6.7.9.1　小核試験）。

肝臓あるいは十二指腸では、クラウドを示す細胞あるいはハローを有する細胞の割合（%）に用量に相関した増加はみられず、ダロルタミドはコメット試験の解析に影響するような過度の毒性を誘発しなかった。肝臓及び十二指腸を用いたコメット試験の解析から、被験薬投与群における Tail intensity 及び Tail moment の値は対照群と同様であった。被験薬投与群におけるコメット試験パラメータに明らかな増加は認められなかったことから、DNA 損傷誘発能は有さないと考えられた。陽性対照エチルメタンスルホネート（EMS）では mnPCE の明らかな増加及び肝細胞及び十二指腸における DNA 損傷が誘発された（2.6.7.9.2　肝臓コメット試験及び 2.6.7.9.3 十二指腸コメット試験）。各投与群におけるダロルタミドの全身曝露量（$C_{max}$ 及び AUC）は、男性被験者にダロルタミドの 600mg を 1 日 2 回経口投与したときの曝露量を十分に上回っていた（表 2.6.6.9- 3）。

以上の 3 試験成績から、ダロルタミドには遺伝毒性のリスクはないと結論した。

### 2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

ダロルタミドは進行性前立腺癌の治療薬として開発していることから、ICH S9 ガイドラインに従ってがん原性試験は実施しなかった。雌雄ラット及びイヌの長期反復投与毒性試験において、臨床曝露量のおよそ 4～5 倍（AUC 比）までオフターゲットの毒性や増殖性病変は認められなかった。また、ダロルタミドには遺伝毒性のリスクがないことが示されている。

### 2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

ダロルタミドに関する生殖発生毒性試験は実施していない。

ラット及びイヌの反復投与毒性試験において生殖器の病理組織学的検査を実施した。ラット及びイヌの雄性生殖器では、ダロルタミドの有する抗アンドロゲン作用による変化がみられた。これらの変化は、4～8 週間の休薬期間終了後、イヌの 13 週間及び 39 週間毒性試験では回復傾向を示し、ラットの 26 週間毒性試験では完全に回復したことから、回復性の変化と考えられた。

患者集団に妊娠可能な女性を含まないため、発生毒性は検討しなかった。

### 2.6.6.7　局所刺激性試験

ダロルタミドに関する局所刺激性試験は実施していない。反復投与毒性試験において、胃腸管について病理学的に評価した結果、治験薬投与に関連すると考えられる局所刺激性所見は認められなかった。

### 2.6.6.8　その他の毒性試験

#### 2.6.6.8.1　光毒性

参照項目：4.2.3.7.7.1　R-9671

ダロルタミド及びその代謝物 M-1 は、290nm を極大として紫外線 B 波（UVB）領域（290～320nm）において光を吸収する。ダロルタミド及び M-1 のモル吸光係数はそれぞれ 23100 及び 22500L $mol^{-1}$ $cm^{-1}$であり、閾値とされる 1000L $mol^{-1}$ $cm^{-1}$を上回った。

先に実施した溶解度の評価から、ガイドラインに示されている最高濃度でもあり、溶解性の上限である 100mg/L までのダロルタミドについて、以下のように光毒性を検討した。

培養マウス線維細胞を用いた *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験を 300nm 以上の波長の光（約 30 分間の UVB 照射量：22mJ/$cm^2$）で実施した。本試験では陽性対照として塩酸プロメタジンを用いて評価した。

その結果、ダロルタミドに光毒性は認められなかった。

#### 2.6.6.8.2　不純物

ICH M7 ガイドラインに基づく毒性学的懸念の閾値（TTC）を超えて検出された潜在的又は既知の遺伝毒性不純物は認められなかった（2.3.S.2.4.1）。

## 2.6.6.9　考察及び結論

ダロルタミド経口投与時の急性毒性は弱かった。初期の用量設定試験において、ラット（雌）にダロルタミドの 2000mg/kg/日を 3 日間、イヌ（雌雄）に 1000mg/kg/日を同じく 3 日間反復経口投与したところ、死亡例はみられず、（吸収されなかった被験物質の排泄と考えられる白色便を除き）一般症状の発現も認められなかった。

ラットに最大 1000mg/kg/日（500×2mg/kg）を 26 週間、イヌに最大 800mg/kg/日を 4 週間及び最大 400mg/kg/日（200×2mg/kg）を 39 週間反復経口投与したところ、良好な忍容性が認められた。これら試験では、体重増加量の軽度減少、摂餌量の減少、前立腺及び精巣上体重量の減少、前立腺及び精嚢における分泌の減少／萎縮、精巣上体における上皮の萎縮／管径の縮小／精子減少症、並びに精巣重量の減少（軽度、ラットのみ）がみられ、これらすべての影響はダロルタミドの有する抗アンドロゲン作用に直接関連するものであった。特にラットで認められた精巣上体管径の縮小、並びに精巣上体及び精巣重量の減少は、精子産生の減少を反映したものと考えられた。一方、すべてのステージの精子（細胞）が存在し、精細管には巨（精子）細胞などの異常細胞は認められず、また、精巣上体に脱落細胞は認められなかったことから、定性的に精子産生能は正常に維持されていると考えられた。

イヌ 39 週間毒性試験の精巣においては、重量増加及び病理組織学的変化（精細管の拡張、精細管の変性及び肉芽腫性炎症を伴う精細管内精子貯留）がみられたが、これらは精巣ホルモン環境の長期変化及び精巣上体で認められた変化（精巣上体上皮の萎縮及び管径の縮小）に続発した結果と推測される。精巣では背圧によって精細管の拡張及び精子貯留に続き、精細管の変性や肉芽腫性変化がみられることが知られている[3)]。ラット及びイヌで認められた生殖器系の変化は、4 あるいは 8 週間の休薬期間終了時には完全な回復あるいは回復傾向を示した。

ラット 26 週間反復投与試験では、軽微から軽度の乳腺萎縮がすべての被験薬投与群の雄で、また下垂体前葉における空胞形成の軽微な増加が各被験薬投与群の雄数例でみられたが、これらもホルモンの不均衡を反映したものと推測された。これらの所見も 4 週間の休薬後には完全に回復した。

いずれの動物種においても、オフターゲットの毒性は認められなかった。雌ラット及び雌イヌでは注目すべき所見は認められなかった。また、毒性試験で検討した用量において、いずれの動物種にも痙攣は認められなかった。この結果はオフターゲットの痙攣誘発作用を有するとされる非ステロイド系 AR シグナル伝達阻害薬（フルタミド、エンザルタミド及びアパルタミド）について報告されている成績[2, 4)]とは異なり、その要因としてダロルタミドの低い脳移行性（脳中濃度／血漿中濃度比が低いこと；2.6.4.4.2　臓器・組織分布）の寄与が推察される。

ラット及びイヌではダロルタミドの曝露量は用量比例性を下回る増加を示し、イヌでは 400mg/kg の反復投与で曝露／吸収の飽和がみられた。血漿中における反復投与による蓄積性は認められなかった（2.6.4.3.2　反復投与後の薬物動態　参照）。ラット及びイヌの反復投与毒性試験において、最高用量（無毒性量と考えられる）を投与したときのダロルタミド（2 種類のジアステレオマーの総和）の全身曝露量（AUC 及び $C_{max}$）は、男性被験者にダロルタミド 600mg を 1 日 2 回投与したときの曝露量を上回っていた（雄動物 AUC 比で 2.0～3.6 倍）。主要な反復投与試験における曝露量とヒトでの曝露量の比較を表 2.6.6.9- 1 及び表 2.6.6.9- 2 示す。検討した血漿中濃度では血漿タンパク結合の非結合分率が動物種間で大きく異ならなかったこと（2.6.4.4.1　血漿タンパク結合と血球移行）から、曝露量は非結合型分率で補正しない、総濃度に基づく AUC（0-24）及び $C_{max}$ で種間比較した。

細菌を用いる復帰突然変異試験において、ダロルタミドに変異原性は認められなかった。一方、培養ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験では、200μg/mL 以上の高濃度で染色体構造異常が誘発された。この陽性結果を受けて、ラットを用いる *in vivo* 小核試験及びコメット試験（最高1000mg/kg/日までを 3 日間経口投与）を追加実施した。これらの *in vivo* 試験において、ダロルタミドに遺伝毒性は認められなかった。このときのダロルタミドの全身曝露量は、男性被験者にダロルタミド 600mg を 1 日 2 回経口投与したときの曝露量より高かった（表 2.6.6.9- 3）。以上の結果から、ダロルタミドはヒトに対する遺伝毒性のリスクはないと考えられた。

*In vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験の結果から、ダロルタミドに光毒性はないことが示された。

AR シグナル伝達阻害薬としての作用機序及び一連の反復投与毒性試験成績から、ダロルタミドは雄生殖能に障害を及ぼすと考えられるものの、その影響は休薬により回復する可逆性のものであると考えられる。

表 2.6.6.9- 1 ラット及びイヌ反復投与毒性試験における定常状態でのダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の AUC、M/R 比、並びに予定臨床用量投与時のダロルタミドのヒト曝露量（AUC）との曝露量（AUC）の比

| Study/ dose levels (mg/kg/day) | Gender | Daro-lutamide[a] | (*S,R*)-daro-lutamide | (*S,S*)-daro-lutamide | M-1 | M/R[b] | Exposure multiple[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $AUC_{(0-24)}$ (h·ng/mL) | | | | | |
| Rat, 28-day study (4 M + 4 F) | | | Week 4 | | | | |
| 100 | Male | 88100 | 40400 | 47600 | 104000 | 1.2 | 1.5 |
| | Female | 160000 | 95700 | 64700 | 144000 | 0.9 | 2.8 |
| 300 | Male | 147000 | 65200 | 82000 | 198000 | 1.3 | 2.6 |
| | Female | 216000 | 124000 | 91700 | 209000 | 1.0 | 3.8 |
| 1000 | Male | 207000 | 81700 | 124000 | 277000 | 1.3 | 3.6 |
| | Female | 242000 | 111000 | 130000 | 248000 | 1.0 | 4.2 |
| Rat, 26-week study (5 M + 5 F) | | | Week 26 | | | | |
| 100 (50 × 2) | Male | 66800 | 35600 | 31100 | 73200 | 1.1 | 1.2 |
| | Female | 132000 | 84500 | 47800 | 106000 | 0.8 | 2.3 |
| 300 (150 × 2) | Male | 105000 | 56500 | 48900 | 114000 | 1.1 | 1.8 |
| | Female | 193000 | 118000 | 75600 | 146000 | 0.8 | 3.4 |
| 1000 (500 × 2) | Male | 135000 | 69400 | 65400 | 139000 | 1.0 | 2.3 |
| | Female | 292000 | 177000 | 115000 | 253000 | 0.9 | 5.1 |
| Dog, 28-day study (4 M) | | | Week 4 | | | | |
| 50 | Male | 71000 | 65200 | 5820 | 51200 | 0.7 | 1.2 |
| 200 | Male | 157000 | 145000 | 12200 | 104000 | 0.7 | 2.7 |
| 800 | Male | 162000 | 145000 | 16900 | 107000 | 0.7 | 2.8 |
| Dog, 13-week study (4-6 M, 4-6 F) | | | Week 13 | | | | |
| 50 (25 × 2) | Male | 85800 | 77600 | 8250 | 80300 | 0.9 | 1.5 |
| | Female | 92400 | 82500 | 9860 | 67800 | 0.7 | 1.6 |
| 150 (75 × 2) | Male | 115000 | 107000 | 7520 | 79400 | 0.7 | 2.0 |
| | Female | 120000 | 109000 | 11900 | 123000 | 1.0 | 2.1 |
| 400 (200 × 2) | Male | 116000 | 103000 | 12500 | 96300 | 0.8 | 2.0 |
| | Female | 166000 | 144000 | 21200 | 123000 | 0.7 | 2.9 |
| Dog, 39-week study (4-6 M, 4-6 F) | | | Week 39 | | | | |
| 50 (25 × 2) | Male | 96700 | 89000 | 7600 | 72600 | 0.8 | 1.7 |
| | Female | 78100 | 71500 | 6660 | 58400 | 0.7 | 1.4 |
| 150 (75 × 2) | Male | 103000 | 93100 | 9840 | 75200 | 0.7 | 1.8 |
| | Female | 145000 | 132000 | 13400 | 135000 | 0.9 | 2.5 |
| 400 (200 × 2) | Male | 206000 | 186000 | 19200 | 152000 | 0.7 | 3.6 |
| | Female | 217000 | 199000 | 18700 | 166000 | 0.8 | 3.8 |

M : male, F : female

a = The sum of measured concentrations of (*S,R*)-darolutamide and (*S,S*)-darolutamide was used in PK calculations

b = metabolite to parent ratio using AUC(0-24) of darolutamide as parent value

c = The exposure multiples were calculated by dividing AUC(0-24) of darolutamide achieved in the toxicity studies in rat or dog by an AUC(0-24) of 57.6 h × µg/mL [extrapolated from the reported steady state AUC(0-12)] achieved in male volunteers following repeated oral doses of 600 mg twice a day*

*Data source: Module 5.3.3.4.1 PH-39412

表 2.6.6.9- 2 ラット及びイヌ反復投与毒性試験における定常状態でのダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の $C_{max}$、M/R 比、並びに予定臨床用量投与時のダロルタミドのヒト曝露量（$C_{max}$）との曝露量（$C_{max}$）の比

| Study/ dose levels (mg/kg/day) | Gender | Darolutamide[a] | (*S,R*)-daro-lutamide | (*S,S*)-daro-lutamide | M-1 | M/R[b] | Exposure multiple[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $C_{max}$ (ng/mL) | | | | | |
| Rat, 28-day study (4 M + 4 F) | | | Week 4 | | | | |
| 100 | Male | 9460 | 5250 | 4650 | 11500 | 1.2 | 2.8 |
| | Female | 15500 | 9650 | 5910 | 13400 | 0.9 | 4.7 |
| 300 | Male | 12500 | 6610 | 6830 | 16800 | 1.3 | 3.8 |
| | Female | 18900 | 11900 | 7030 | 17400 | 0.9 | 5.7 |
| 1000 | Male | 14300 | 6220 | 8770 | 18800 | 1.3 | 4.3 |
| | Female | 20200 | 10300 | 10400 | 21000 | 1.0 | 6.1 |
| Rat, 26-week study (5 M + 5 F) | | | Week 26 | | | | |
| 100 (50 × 2) | Male | 4410 | 2520 | 1960 | 4820 | 1.1 | 1.3 |
| | Female | 9400 | 6250 | 3150 | 7510 | 0.8 | 2.8 |
| 300 (150 × 2) | Male | 8040 | 4270 | 3770 | 7970 | 1.0 | 2.4 |
| | Female | 12300 | 7960 | 4370 | 8700 | 0.7 | 3.7 |
| 1000 (500 × 2) | Male | 8480 | 4620 | 3860 | 8340 | 1.0 | 2.5 |
| | Female | 18500 | 11800 | 6650 | 14300 | 0.8 | 5.6 |
| Dog, 28-day study (4 M) | | | Week 4 | | | | |
| 50 | Male | 5030 | 4470 | 647 | 4720 | 0.9 | 1.5 |
| 200 | Male | 9300 | 8380 | 953 | 7780 | 0.8 | 2.8 |
| 800 | Male | 9990 | 8990 | 1290 | 7890 | 0.8 | 3.0 |
| Dog, 13-week study (4-6 M, 4-6 F) | | | Week 13 | | | | |
| 50 (25 × 2) | Male | 4710 | 4250 | 529 | 4650 | 1.0 | 1.4 |
| | Female | 4720 | 4060 | 719 | 3790 | 0.8 | 1.4 |
| 150 (75 × 2) | Male | 6010 | 5450 | 599 | 5250 | 0.9 | 1.8 |
| | Female | 6970 | 6190 | 826 | 9500 | 1.4 | 2.1 |
| 400 (200 × 2) | Male | 6030 | 5310 | 815 | 6070 | 1.0 | 1.8 |
| | Female | 8350 | 7040 | 1390 | 7280 | 0.9 | 2.5 |
| Dog, 39-week study (4-6 M, 4-6 F) | | | Week 39 | | | | |
| 50 (25 × 2) | Male | 5130 | 4610 | 520 | 4440 | 0.9 | 1.5 |
| | Female | 4340 | 3940 | 468 | 3890 | 0.9 | 1.3 |
| 150 (75 × 2) | Male | 5800 | 5090 | 752 | 5420 | 0.9 | 1.7 |
| | Female | 8190 | 7260 | 935 | 8680 | 1.1 | 2.5 |
| 400 (200 × 2) | Male | 12100 | 10600 | 1450 | 10700 | 0.9 | 3.6 |
| | Female | 12400 | 11000 | 1450 | 10500 | 0.8 | 3.7 |

M : male, F : female

a = The sum of measured concentrations of (*S,R*)-darolutamide and (*S,S*)-darolutamide was used in PK calculations

b = metabolite to parent ratio using $C_{max}$ of darolutamide as parent value

c = The exposure multiples were calculated by dividing $C_{max}$ of darolutamide achieved in the toxicity studies in rat or dog by the $C_{max}$ (3.33 µg/mL) achieved in male volunteers following repeated oral doses of 600 mg twice a day*

*Data source: Module 5.3.3.4.1 PH-39412

表 2.6.6.9- 3 ラットを用いた *in vivo* 遺伝毒性試験における定常状態でのダロルタミド、SR 体、SS 体及び M-1 の AUC 及び $C_{max}$、M/R 比、並びに予定臨床用量投与時のダロルタミドのヒト曝露量（AUC 及び $C_{max}$）との曝露量（AUC 及び $C_{max}$）の比

| Study/ dose levels (mg/kg/day) | Gender | Daro-lutamide[a] | (*S*,*R*)-daro-lutamide | (*S*,*S*)-daro-lutamide | M-1 | M/R[b] | Exposure multiple[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **$AUC_{(0-24)}$ (h·ng/mL)** | | | | | | | |
| 100 | Male | 191000 | 71700 | 120000 | 319000 | 1.7 | 3.3 |
| 500 | Male | 339000 | 114000 | 225000 | 702000 | 2.1 | 5.9 |
| 1000 | Male | 311000 | 104000 | 207000 | 555000 | 1.8 | 5.4 |
| **$C_{max}$ (ng/mL)** | | | | | | | |
| 100 | Male | 15000 | 5830 | 9210 | 26700 | 1.8 | 4.5 |
| 500 | Male | 28300 | 9830 | 19200 | 53000 | 1.9 | 8.5 |
| 1000 | Male | 22000 | 7460 | 14600 | 38900 | 1.8 | 6.6 |

a = The sum of measured concentrations of (*S*,*R*)-darolutamide and (*S*,*S*)-darolutamide was used in PK calculations

b = metabolite to parent ratio using AUC(0-24) or $C_{max}$ of darolutamide as parent value

c = The exposure multiples were calculated by dividing AUC(0-24) or $C_{max}$ of darolutamide achieved after 3-day dosing in the rat by an AUC(0-24) of 57.6 h × µg/mL [extrapolated from the reported steady state AUC(0-12)] or the $C_{max}$ of 3.33 µg/mL achieved in male volunteers following repeated oral doses of 600 mg twice a day*

*Data source: Module 5.3.3.4.1 PH-39412

### 2.6.6.10　図表

図表は適切に記載した。

## 引用文献一覧

1) イクスタンジカプセル40mg／エンザルタミド、4.非臨床に関する概括評価及び8.非臨床概要 (3) 毒性、アステラス製薬株式会社 (2014) 医薬品医療機器総合機構：公開申請資料概要

2) CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH APPLICATION NUMBER: 210951Orig1s000, MULTI-DISCIPLINE REVIEW_for ERLEADA (FDA approved evaluation summary) 2018 (4.3.20)

3) Creasy D et al., Toxicol Pathol 2012: 40, 6S: 40S-121S (4.3.14)

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

## 2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

**Test Article:** darolutamide

**Overview of Toxicology Studies**

| Type of Study/ Treatment Duration | Species/ Strain | Method of Administration | Doses [mg/kg] / Concentrations | GLP | Test Facility | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Repeat-Dose Toxicity** | | | | | | | |
| 3 days [a] | Rat, Wistar | Oral, gavage | 500, 1000, 2000 | No | Orion (FIN) | R-9726 | 4.2.3.2.1 |
| 7 days [a] | Rat, Wistar | Oral, gavage | 1000 | No | [redacted] (FRA) | R-9675 | 4.2.3.2.2 |
| 14 days [a] | Rat, Wistar | Oral, gavage | 0, 50, 200, 800 | No | [redacted] (UK) | R-9669 | 4.2.3.2.3 |
| 28 days [a] | Rat, Wistar | Oral, gavage | 0, 100, 300, 1000 | Yes | [redacted] (UK) | R-9668 | 4.2.3.2.4 |
| 26 weeks [b] + 4-week recovery | Rat, Wistar | Oral, gavage | 0, 100, 300, 1000 | Yes | [redacted] (FRA) | R-9678 | 4.2.3.2.5 |
| 7 days [a] | Dog, Beagle | Oral, gavage | 0-50-200-400-800-1000[c] | No | [redacted] (UK) | R-9670 | 4.2.3.2.6 |
| 14 days [a+b] | Dog, Beagle | Oral, gavage | 0, 200-400-800-1000[c] | No | [redacted] (FRA) | R-11057 | 4.2.3.2.7 |
| 28 days [a] | Dog, Beagle | Oral, gavage | 0, 50, 200, 800 | Yes | [redacted] (UK) | R-9667 | 4.2.3.2.8 |
| 13 weeks [b] + 4-week recovery | Dog, Beagle | Oral, gavage | 0, 50, 150, 400 | Yes | [redacted] (FRA) | R-9672 | 4.2.3.2.9 |
| 39 weeks [b] + 8-week recovery | Dog, Beagle | Oral, gavage | 0, 50, 150, 400 | Yes | [redacted] (FRA) | R-9679 | 4.2.3.2.10 |
| **Genotoxicity** | | | | | | | |
| ***In vitro*** | | | | | | | |
| Salmonella/ microsome assay | Salmonella strains | *In vitro* | up to 5000 µg/plate | Yes | [redacted] (DEU) | R-9724 | 4.2.3.3.1.1 |
| Cytogenetics *in vitro* test | Human Lymphocytes | *In vitro* | up to 400 µg/mL | Yes | [redacted] (DEU) | R-9725 | 4.2.3.3.1.2 |
| ***In vivo*** | | | | | | | |
| Combined bone marrow micronucleus test and Comet assay in liver & duodenum | Rat, Wistar | Oral, gavage | 100, 500, 1000 (once daily for 3 days) | Yes | [redacted] (UK) | R-9674 | 4.2.3.3.2.1 |
| **Other toxicity studies** | | | | | | | |
| 3T3 NRU test | Mouse fibroblasts | *In vitro* (3T3.A31) | up to 100 mg/L | Yes | [redacted] (US) | R-9671 | 4.2.3.7.7.1 |

Orion: Orion corporation, Orion Pharma, NOAELs were underlined , a: once daily, b: twice daily, c: dose escalation & fixed repeated-dose (1000 or 0, 400, 800 mg/kg)

## 2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

**Test Article:** darolutamide

**Overview of Toxicokinetic Studies**

| Type of Study/ Treatment Duration | Species/ Strain | Method of Administration | Doses/ Concentrations | GLP | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Repeat-Dose Toxicity** | | | | | | |
| 28 days | Rat, Wistar | Oral, gavage | 100, 300, 1000 mg/kg | Yes | R-9668 | 4.2.3.2.4 |
| 26 weeks + recovery | Rat, Wistar | Oral, gavage | 100, 300, 1000 mg/kg | Yes | R-9678 | 4.2.3.2.5 |
| 28 days | Dog, Beagle | Oral, gavage | 50, 200, 800 mg/kg | Yes | R-9667 | 4.2.3.2.8 |
| 13 weeks + recovery | Dog, Beagle | Oral, gavage | 50, 150, 400 mg/kg | Yes | R-9672 | 4.2.3.2.9 |
| 39 weeks + recovery | Dog, Beagle | Oral, gavage | 50, 150, 400 mg/kg | Yes | R-9679 | 4.2.3.2.10 |
| **Genotoxicity** | | | | | | |
| Combined bone marrow micronucleus test and comet assay in liver & duodenum | Rat, Wistar | Oral, gavagel | 100, 500, 1000 mg/kg | Yes | R-9674 | 4.2.3.3.2.1 |

## 2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

**Test Article:** darolutamide

**Overview of Toxicokinetics Data in Pivotal Studies**

| Daily dose | Unit | Sex | Total exposure | | | | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $C_{max}$ | | $AUC_{(0-24)}$ | | | |
| | | | [ng/mL] | MoE | [ng·h/mL] | MoE | | |
| **Rat** | | | | | | | | |
| 100[1] | mg/kg | M | 5250 | | 40400 | | R-9668 | 4.2.3.2.4 |
| 100[1] | mg/kg | F | 9650 | | 95700 | | (28-day) | |
| 100[2] | mg/kg | M | 4650 | | 47600 | | | |
| 100[2] | mg/kg | F | 5910 | | 64700 | | | |
| 100[3] | mg/kg | M | 9460 | 2.8 | 88100 | 1.5 | | |
| 100[3] | mg/kg | F | 15500 | 4.7 | 160000 | 2.8 | | |
| 100[4] | mg/kg | M | 11500 | 1.4 | 104000 | 0.8 | | |
| 100[4] | mg/kg | F | 13400 | 1.7 | 144000 | 1.1 | | |
| 100[1] | mg/kg | M | 2520 | | 35600 | | R-9678 | 4.2.3.2.5 |
| 100[1] | mg/kg | F | 6250 | | 84500 | | (26-week) | |
| 100[2] | mg/kg | M | 1960 | | 31100 | | | |
| 100[2] | mg/kg | F | 3150 | | 47800 | | | |
| 100[3] | mg/kg | M | 4410 | 1.3 | 66800 | 1.2 | | |
| 100[3] | mg/kg | F | 9400 | 2.8 | 132000 | 2.3 | | |
| 100[4] | mg/kg | M | 4820 | 0.6 | 73200 | 0.6 | | |
| 100[4] | mg/kg | F | 7510 | 0.9 | 106000 | 0.8 | | |
| 100[1] | mg/kg | M | 5830 | | 71700 | | R-9674 | 4.2.3.3.2.1 |
| 100[2] | mg/kg | M | 9210 | | 120000 | | (Genotox.) | |
| 100[3] | mg/kg | M | 15000 | 4.5 | 191000 | 3.3 | | |
| 100[4] | mg/kg | M | 26700 | 3.3 | 319000 | 2.4 | | |
| 300[1] | mg/kg | M | 6610 | | 65200 | | R-9668 | 4.2.3.2.4 |
| 300[1] | mg/kg | F | 11900 | | 124000 | | (28-day) | |
| 300[2] | mg/kg | M | 6830 | | 82000 | | | |
| 300[2] | mg/kg | F | 7030 | | 91700 | | | |
| 300[3] | mg/kg | M | 12500 | 3.8 | 147000 | 2.6 | | |
| 300[3] | mg/kg | F | 18900 | 5.7 | 216000 | 3.8 | | |

**Overview of Toxicokinetics Data in Pivotal Studies (Continued)**

| Daily dose | Unit | Sex | Total exposure | | | | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $C_{max}$ | | $AUC_{(0-24)}$ | | | |
| | | | [ng/mL] | MoE | [ng·h/mL] | MoE | | |
| 300[4] | mg/kg | M | 16800 | 2.1 | 198000 | 1.5 | R-9668 | 4.2.3.2.4 |
| 300[4] | mg/kg | F | 17400 | 2.2 | 209000 | 1.6 | (28-day) | |
| 300[1] | mg/kg | M | 4270 | | 56500 | | R-9678 | 4.2.3.2.5 |
| 300[1] | mg/kg | F | 7960 | | 118000 | | (26-week) | |
| 300[2] | mg/kg | M | 3770 | | 48900 | | | |
| 300[2] | mg/kg | F | 4370 | | 75600 | | | |
| 300[3] | mg/kg | M | 8040 | 2.4 | 105000 | 1.8 | | |
| 300[3] | mg/kg | F | 12300 | 3.7 | 193000 | 3.4 | | |
| 300[4] | mg/kg | M | 7970 | 1.0 | 114000 | 0.9 | | |
| 300[4] | mg/kg | F | 8700 | 1.1 | 146000 | 1.1 | | |
| 500[1] | mg/kg | M | 9830 | | 114000 | | R-9674 | 4.2.3.3.2.1 |
| 500[2] | mg/kg | M | 19200 | | 225000 | | (Genotox.) | |
| 500[3] | mg/kg | M | 28300 | 8.5 | 339000 | 5.9 | | |
| 500[4] | mg/kg | M | 53000 | 6.6 | 702000 | 5.3 | | |
| 1000[1] | mg/kg | M | 6220 | | 81700 | | R-9668 | 4.2.3.2.4 |
| 1000[1] | mg/kg | F | 10300 | | 111000 | | (28-day) | |
| 1000[2] | mg/kg | M | 8770 | | 124000 | | | |
| 1000[2] | mg/kg | F | 10400 | | 130000 | | | |
| 1000[3] | mg/kg | M | 14300 | 4.3 | 207000 | 3.6 | | |
| 1000[3] | mg/kg | F | 20200 | 6.1 | 242000 | 4.2 | | |
| 1000[4] | mg/kg | M | 18800 | 2.4 | 277000 | 2.1 | | |
| 1000[4] | mg/kg | F | 21000 | 2.6 | 248000 | 1.9 | | |
| 1000[1] | mg/kg | M | 4620 | | 69400 | | R-9678 | 4.2.3.2.5 |
| 1000[1] | mg/kg | F | 11800 | | 177000 | | (26-week) | |
| 1000[2] | mg/kg | M | 3860 | | 65400 | | | |
| 1000[2] | mg/kg | F | 6650 | | 115000 | | | |
| 1000[3] | mg/kg | M | 8480 | 2.5 | 135000 | 2.3 | | |
| 1000[3] | mg/kg | F | 18500 | 5.6 | 292000 | 5.1 | | |
| 1000[4] | mg/kg | M | 8340 | 1.0 | 139000 | 1.1 | | |
| 1000[4] | mg/kg | F | 14300 | 1.8 | 253000 | 1.9 | | |
| 1000[1] | mg/kg | M | 7460 | | 104000 | | R-9674 | 4.2.3.3.2.1 |
| 1000[2] | mg/kg | M | 14600 | | 207000 | | (Genotox.) | |

**Overview of Toxicokinetics Data in Pivotal Studies (Continued)**

| Daily dose | Unit | Sex | Total exposure | | | | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $C_{max}$ | | $AUC_{(0-24)}$ | | | |
| | | | [ng/mL] | MoE | [ng·h/mL] | MoE | | |
| 1000[3] | mg/kg | M | 22000 | 6.6 | 311000 | 5.4 | R-9674 | 4.2.3.3.2.1 |
| 1000[4] | mg/kg | M | 38900 | 4.9 | 555000 | 4.2 | (Genotox.) | |
| **Dog** | | | | | | | | |
| 50[1] | mg/kg | M | 4470 | | 65200 | | R-9667 | 4.2.3.2.8 |
| 50[2] | mg/kg | M | 647 | | 5820 | | (28-day) | |
| 50[3] | mg/kg | M | 5030 | 1.5 | 71000 | 1.2 | | |
| 50[4] | mg/kg | M | 4720 | 0.6 | 51200 | 0.4 | | |
| 50[1] | mg/kg | M | 4250 | | 77600 | | R-9672 | 4.2.3.2.9 |
| 50[1] | mg/kg | F | 4060 | | 82500 | | (13-week) | |
| 50[2] | mg/kg | M | 529 | | 8250 | | | |
| 50[2] | mg/kg | F | 719 | | 9860 | | | |
| 50[3] | mg/kg | M | 4710 | 1.4 | 85800 | 1.5 | | |
| 50[3] | mg/kg | F | 4720 | 1.4 | 92400 | 1.6 | | |
| 50[4] | mg/kg | M | 4650 | 0.6 | 80300 | 0.6 | | |
| 50[4] | mg/kg | F | 3790 | 0.5 | 67800 | 0.5 | | |
| 50[1] | mg/kg | M | 4610 | | 89000 | | R-9679 | 4.2.3.2.10 |
| 50[1] | mg/kg | F | 3940 | | 71500 | | (39-week) | |
| 50[2] | mg/kg | M | 520 | | 7600 | | | |
| 50[2] | mg/kg | F | 468 | | 6660 | | | |
| 50[3] | mg/kg | M | 5130 | 1.5 | 96700 | 1.7 | | |
| 50[3] | mg/kg | F | 4340 | 1.3 | 78100 | 1.4 | | |
| 50[4] | mg/kg | M | 4440 | 0.6 | 72600 | 0.6 | | |
| 50[4] | mg/kg | F | 3790 | 0.5 | 58400 | 0.4 | | |
| 150[1] | mg/kg | M | 5450 | | 107000 | | R-9672 | 4.2.3.2.9 |
| 150[1] | mg/kg | F | 6190 | | 109000 | | (13-week) | |
| 150[2] | mg/kg | M | 599 | | 7520 | | | |

**Overview of Toxicokinetics Data in Pivotal Studies (Continued)**

| Daily dose | Unit | Sex | Total exposure | | | | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $C_{max}$ | | $AUC_{(0-24)}$ | | | |
| | | | [ng/mL] | MoE | [ng·h/mL] | MoE | | |
| 150[2] | mg/kg | F | 826 | | 11900 | | R-9672 | 4.2.3.2.9 |
| 150[3] | mg/kg | M | 6010 | 1.8 | 115000 | 2.0 | (13-week) | |
| 150[3] | mg/kg | F | 6970 | 2.1 | 120000 | 2.1 | | |
| 150[4] | mg/kg | M | 5250 | 0.7 | 79400 | 0.6 | | |
| 150[4] | mg/kg | F | 9500 | 1.2 | 123000 | 0.9 | | |
| 150[1] | mg/kg | M | 5090 | | 93100 | | R-9679 | 4.2.3.2.10 |
| 150[1] | mg/kg | F | 7260 | | 132000 | | (39-week) | |
| 150[2] | mg/kg | M | 752 | | 9840 | | | |
| 150[2] | mg/kg | F | 935 | | 13400 | | | |
| 150[3] | mg/kg | M | 5800 | 1.7 | 103000 | 1.8 | | |
| 150[3] | mg/kg | F | 8190 | 2.5 | 145000 | 2.5 | | |
| 150[4] | mg/kg | M | 5420 | 0.7 | 75200 | 0.6 | | |
| 150[4] | mg/kg | F | 8680 | 1.1 | 135000 | 1.0 | | |
| 200[1] | mg/kg | M | 8380 | | 145000 | | R-9667 | 4.2.3.2.8 |
| 200[2] | mg/kg | M | 953 | | 12200 | | (28-day) | |
| 200[3] | mg/kg | M | 9300 | 2.8 | 157000 | 2.7 | | |
| 200[4] | mg/kg | M | 7780 | 1.0 | 104000 | 0.8 | | |
| 400[1] | mg/kg | M | 5310 | | 103000 | | R-9672 | 4.2.3.2.9 |
| 400[1] | mg/kg | F | 7040 | | 144000 | | (13-week) | |
| 400[2] | mg/kg | M | 815 | | 12500 | | | |
| 400[2] | mg/kg | F | 1390 | | 21200 | | | |
| 400[3] | mg/kg | M | 6030 | 1.8 | 116000 | 2.0 | | |
| 400[3] | mg/kg | F | 8350 | 2.5 | 166000 | 2.9 | | |
| 400[4] | mg/kg | M | 6070 | 0.8 | 96300 | 0.7 | | |
| 400[4] | mg/kg | F | 7280 | 0.9 | 123000 | 0.9 | | |
| 400[1] | mg/kg | M | 10600 | | 186000 | | R-9679 | 4.2.3.2.10 |
| 400[1] | mg/kg | F | 11000 | | 199000 | | (39-week) | |

**Overview of Toxicokinetics Data in Pivotal Studies (Continued)**

| Daily dose | Unit | Sex | Total exposure | | | | Report No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $C_{max}$ | | $AUC_{(0-24)}$ | | | |
| | | | [ng/mL] | MoE | [ng·h/mL] | MoE | | |
| 400[2] | mg/kg | M | 1450 | | 19200 | | R-9679 | 4.2.3.2.10 |
| 400[2] | mg/kg | F | 1450 | | 18700 | | (39-week) | |
| 400[3] | mg/kg | M | 12100 | 3.6 | 206000 | 3.6 | | |
| 400[3] | mg/kg | F | 12400 | 3.7 | 217000 | 3.8 | | |
| 400[4] | mg/kg | M | 10700 | 1.3 | 152000 | 1.2 | | |
| 400[4] | mg/kg | F | 10500 | 1.3 | 166000 | 1.3 | | |
| 800[1] | mg/kg | M | 8990 | | 145000 | | R-9667 | 4.2.3.2.8 |
| 800[2] | mg/kg | M | 1290 | | 16900 | | (28-day) | |
| 800[3] | mg/kg | M | 9990 | 3.0 | 162000 | 2.8 | | |
| 800[4] | mg/kg | M | 7890 | 1.0 | 107000 | 0.8 | | |
| **Human exposure** | | | | | | | | |
| 600 [3] | mg/day | M | 3330 | 1 | 57600 | 1 | PH-39412 | 5.3.3.4.1 |
| 600 [4] | mg/day | M | 7980 | 1 | 131800 | 1 | | |

M: male, F: female
MoE = margins of exposure (when compared to the human plasma levels)
[1] (*S,R*)-darolutamide, [2] (*S,S*)-darolutamide, [3] darolutamide =(*S,R*)-darolutamide + (*S,S*)-darolutamide
[4] keto-darolutamide

## 2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

**Test Article**: darolutamide

**Drug Substance – Characteristics of Batches used in Toxicological Pivotal Studies**

| Batch No. | Purity | Organic Impurities | | | | | Type of Study | Location in CTD (Report No.) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | (*S,R*)-darolu-tamide | (*S,S*)-darolu-tamide | 不純物A* | Any unspecified | Total organic impurities | | | |
| Proposed Specification | | | | | | | | | |
| | [%] | [%] | [%] | [%] | [%] | [%] | | | |
| 25 | | | | | | | Ames test | 4.2.3.3.1.1 | (R-9724) |
| 26 | | | | | | | 28-days Repeat-Dose, Dogs | 4.2.3.2.8 | (R-9667) |
| 27 | | | | | | | 28-days Repeat-Dose, Rats | 4.2.3.2.4 | (R-9668) |
| | | | | | | | 28-days Repeat-Dose, Dogs | 4.2.3.2.8 | (R-9667) |
| 24 | | | | | | | Combined *in vivo* genotoxicity | 4.2.3.3.2.1 | (R-9674) |
| | | | | | | | Phototoxicity | 4.2.3.7.7.1 | (R-9671) |
| 1420523 | | | | | | | Chromosome Aberration | 4.2.3.3.1.2 | (R-9725) |
| 1472621 | | | | | | | 13-ws Repeat-Dose, Dogs | 4.2.3.2.9 | (R-9672) |
| | | | | | | | 26-ws Repeat-Dose, Rats | 4.2.3.2.5 | (R-9678) |
| 1472623 | | | | | | | 26-ws Repeat-Dose, Rats | 4.2.3.2.5 | (R-9678) |
| 1556342 | | | | | | | 39-ws Repeat-Dose, Dogs | 4.2.3.2.10 | (R-9679) |

＊新薬承認情報提供時に置換

## 2.6.7.5　単回投与毒性試験

Not applicable

## 2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

**Test Article:** darolutamide

**Repeat Dose Toxicity - Non-pivotal Studies**

| Species/ Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing, Doses | Gender (No. per Group) | NOAEL mg/kg/day | Noteworthy findings | Location in CTD (Report No.) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat/ Wistar | Oral, gavage (0.5% aqueous methylcellulose solution) | for three consecutive days 500, 1000, 2000 mg/kg | M (2) | 2000 | Up to the high dose : well tolerated. Only transient and slight decrease of body weigt gain found at 2000 mg/kg dosed animals on day 1. Post mortem investigations revealed macroscopie findings (small seminal vesicles) related to the pharmacological activity of the test item.<br>MTD: > 2000 mg/kg | 4.2.3.2.1 (R-9726) |
| Rat/ Wistar | Oral, gavage (0.5% aqueous methylcellulose with 0.5% Tween 80) | Daily for 7 days 1000 mg/kg 500x2 mg/kg | M/F (4/4) | 1000 (500 x2) | Darolutamide was well tolerated after repeated daily doses of 1000 mg/kg/day of different batches of darolutamide.<br>The highest maximum plasma concentrations of the parent compound (sum of the 2 diastereomers) and the keto-darolutamide were generally achieved with the GLP batch given once daily. For the GMP batch, they were generally observed after the second administration when given twice daily. | 4.2.3.2.2 (R-9675) |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat Dose Toxicity - Non-pivotal Studies (Continued)**

| Species/ Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing, Doses | Gender (No. per Group) | NOAEL mg/kg/day | Noteworthy findings | Location in CTD (Report No.) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat/ Wistar | Oral, gavage (0.5% aqueous methylcellulose with 0.5% Tween 80) | Daily for 14 days 0, 50, 200, 800 mg/kg | M/F (4/4) | 800 | Darolutamide was well tolerated up to the highest dose administered.<br>Histopathological female phenotype of the male mammary gland, low prostate weight (correlated with reduced secretion), secretory reduction of the seminal vesicles and low epididymides weights were found as the anti-androgenic properties.<br>A subproportional increase in systemic exposure to darolutamide and its keto-darolutamide were apparent with increasing dose (as indicated by dose adjusted AUC(0-inf), AUC(0-t) and Cmax estimates) which likely suggested limitations in absorption of darolutamide at high oral doses. | 4.2.3.2.3 (R-9669) |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat Dose Toxicity - Non-pivotal Studies (Continued)**

| Species/ Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing, Doses | Gender (No. per Group) | NOAEL mg/kg/day | Noteworthy findings | Location in CTD (Report No.) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Beagle dog | Oral, gavage (0.5% aqueous methylcellulose with 0.5% Tween 80) | Daily for 3 to 7 days Escalating dose (part A): 50, 200, 400, 800, 1000 mg/kg for a period of 3 days and wash-out period of 3-4 days Repeated-dose (part B): 1000 mg/kg for 7 days | M (2) | 1000 | Darolutamide was well tolerated up to a dose of 800 mg/kg/day over 3 days. A slight body weight loss and post-mortem findings (diffuse atrophy of prostate) related to the pharmacological activity of the test item were seen after 1000 mg/kg/day over 7 days. Occasional white chalky faeces observed after repeated administration of 1000 mg/kg/day (part B). MTD > 1000 mg/kg/day. Toxicokinetic investigations revealed that plasma concentration vs time profiles for all analytes (darolutamide, (S, S)-darolutamide and keto-darolutamide) exhibited absorption or formation phases which were sub-proportional increases in systemic exposure to darolutamide and its keto-metabolite (as indicated by mean AUC(0-t) and Cmax estimates) with increasing dose suggested saturation of absorption of darolutamide and no further meaningful increases in systemic exposure was observed between 800 and 1000 mg/kg/day. | 4.2.3.2.6 (R-9670) |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat Dose Toxicity - Non-pivotal Studies (Continued)**

| Species/ Strain | Method of Administration (Vehicle/ Formulation) | Duration of Dosing, Doses | Gender (No. per Group) | NOAEL mg/kg/day | Noteworthy findings | Location in CTD (Report No.) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Beagle dog | Oral, gavage (0.5% aqueous methylcellulose with 0.5% Tween 80) | Phase1 (escalating dose): 200, 400 mg/kg twice daily or 200, 400, 800 & 1000 mg/kg once daily each 3 days with wash-out period of 3-4 days. Phase 2 (fixed dose); 200, 400 mg/kg twice daily (400 & 800 mg/kg/day) for 2 weeks, Additional escalating dose phase: 200, 400 mg/kg once daily each 3 days with wash-out periods of 3 days | Phase 1: F (2) Phase 2: F (2) Additional phase: M (2) | 1000 | The oral administration of darolutamide in the female dog by escalating dose once daily from 200 to 1000 mg/kg per administration or for two weeks, twice daily with 200 and 400 mg/kg per administration, was well tolerated. There were no histological findings after the two week fixed-dose treatment in females. The administration in the male beagle dog once daily at escalating dose phase from 200 to 400 mg/kg/day was also well tolerated. Except 200 & 400 mg/kg/day dosed groups in Phase 2, white faeces were seen in females. The increase in systemic exposure was slightly less than dose-proportional between 200 and 400 mg/kg per administration or markedly under proportional between 200 and 1000 mg/kg per administration. | 4.2.3.2.7 (R-11057) |

## 2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

### 2.6.7.7.1 ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験

| | |
|---|---|
| Report Title: | ORM-15674: 28 Day Oral (Gavage) Toxicity Study in Rats |
| Report No.: | R-9668 |
| Location in CTD: | 4.2.3.2.4 |
| Test Article: | darolutamide |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Species/Strain: | Rat / Han Wistar CRL:WI (Han) | Study No.: | 517998 |
| Initial age: | 7 to 8 weeks | GLP compliance: | Yes |
| Duration of Dosing: | 28 days | Date of 1st dose: | [redacted] |
| Duration of Postdose: | - | | |
| Method of Administration: | Oral gavage | | |
| Vehicle/Formulation: | vehicle 0.5% (w/v) aqueous methylcellulose (supplied by Colorcon®) with 0.5% (v/v) Tween 80 | | |
| Special features: | - | | |
| NOAEL | 1000 mg/kg/day | | |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 28-Day Toxicity Study, Rat** **Report No.: R-9668**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 100 M | 300 M | 1000 M | 0 (Control) F | 100 F | 300 F | 1000 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| No. of Animals/Time Point | 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| Toxicokinetics (Day 28) [1] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 88060 | 147400 | 206500 | - | 160400 | 215700 | 241700 |
| Cmax (ng/mL) | - | 9460 | 12500 | 14300 | - | 15500 | 18900 | 20200 |
| Toxicokinetics (Day 28 ) [2] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 40400 | 65240 | 81710 | - | 95680 | 123600 | 111000 |
| Cmax (ng/mL) | - | 5250 | 6610 | 6220 | - | 9650 | 11900 | 10300 |
| Toxicokinetics (Day 28 ) [3] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 47580 | 82000 | 124200 | - | 64650 | 91720 | 130100 |
| Cmax (ng/mL) | - | 4650 | 6830 | 8770 | - | 5910 | 7030 | 10400 |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 28-Day Toxicity Study, Rat (Continued)** **Report No.: R-9668**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 100 M | 300 M | 1000 M | 0 (Control) F | 100 F | 300 F | 1000 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Noteworthy Findings | | | | | | | | |
| Died/Sacrificed Moribund | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Body Weight (% of control, d28) | 327 g | -3.1 | -3.4 | -7.0 | 214 g | -2.8 | +3.3 | -2.3 |
| Body weight gain | - | (↓) | (↓) | (↓) | - | - | - | - |
| Food Consumption (% of control, d28) | 21.3 g/day | -7.0 (↓) | -3.8 (↓) | -5.2 (↓) | 16.7 g/day | -1.8 | +1.8 | +0.6 |
| Water Consumption | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical Observations | | | | | | | | |
| Increased salivation (week 4[a]) | - | - | - | observed | - | - | - | observed |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - | - | - | - | - |
| FOB | | | | | | | | |
| Motor Activity (week 3) | - | - | (↓) | (↓) | - | - | (↓) | (↓) |
| Others | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Haematology | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serum Chemistry | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ Weights (% body weight) | | | | | | | | |
| Prostate | 0.1159 | 0.0433** | 0.0407** | 0.0446** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Epididymides | 0.32891 | 0.24155** | 0.22524** | 0.23591** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Thymus | 0.1390 | 0.1919** | 0.1847** | 0.1823** | - | - | - | - |
| Gross Pathology | | | | | | | | |
| Number examined | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Prostate | | | | | | | | |
| small | - | 8 | 5 | 5 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Seminal Vesicle | | | | | | | | |
| small, one/both horns | - | 8 | 8 | 6 | N/A | N/A | N/A | N/A |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 28-Day Toxicity Study, Rat (Continued)** **Report No.: R-9668**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 100 M | 300 M | 1000 M | 0 (Control) F | 100 F | 300 F | 1000 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Epididymis | | | | | | | | |
| small, right | - | - | - | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Testis | | | | | | | | |
| small, right | - | - | - | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Histopathology | | | | | | | | |
| Number examined | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Epididymides | | | | | | | | |
| Diminished in size | 0 | 8 | 10 | 7 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Prostate Gland | | | | | | | | |
| Reduced secretion | | | | | | | | |
| + | 0 | 2 | 1 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 3 | 6 | 6 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| +++ | 0 | 5 | 3 | 3 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Seminal Vesicles | | | | | | | | |
| Reduced secretion | | | | | | | | |
| + | 0 | 3 | 0 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 7 | 8 | 4 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| +++ | 0 | 0 | 2 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++++ | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Thymus | | | | | | | | |
| Decreased cortical lymphocytes | | | | | | | | |
| + | 5 | 1 | 0 | 0 | - | - | - | - |

- : No noteworthy findings (↓): decreased/reduced tendency M : male F: female N/A: not applicable
Statistical analysis: ** p < 0.001 (ANOVA), a: predose & postdose, FOB: Functional Observational Battery
+: minimal, ++: mild, +++: moderate, ++++: marked
[1] darolutamide, [2] (*S,R*)-darolutamide, [3] (*S,S*)-darolutamide

## 2.6.7.7.2 ラットを用いた4週間の回復性評価を含む26週間反復経口投与毒性試験

Report Title: ODM-201: 26-week oral (gavage) toxicity study in the Wistar rat followed by a 4-week treatment-free period
Report No.: R-9678
Location in CTD: 4.2.3.2.5
Test Article: darolutamide

Species/Strain: Rat / Wistar: Crl:WI
Initial age: Approximately 8 weeks
Duration of Dosing: 182 (males) or 183 (females) days
Duration of Postdose: -
Method of Administration: oral gavage (twice daily)
Vehicle/Formulation: 0.5 % (w/v) aqueous methylcellulose with 0.5 % (v/v) Tween 80
Special features: -
NOAEL 1000 mg/kg/day

Study No.: AB14461
GLP compliance: Yes
Date of 1st dose: [redacted]

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Toxicity Study, Rat** **Report No.: R-9678**

| **Daily Dose [mg/kg]** | **0** | **100** | **300** | **1000** | **0** | **100** | **300** | **1000** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gender** | **M** | **M** | **M** | **M** | **F** | **F** | **F** | **F** |
| Number of Animals | 10 +5[a] | 10 | 10 | 10 +5[a] | 10 +5[a] | 10 | 10 | 10 +5[a] |
| No of Animals/ Time Point | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Toxicokinetics (week 26)[1] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 35600 | 56500 | 69400 | - | 84500 | 118000 | 177000 |
| Cmax (ng/mL) | - | 2520 | 4270 | 4620 | - | 6250 | 7960 | 11800 |
| Toxicokinetics (week 26)[2] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 31100 | 48900 | 65400 | - | 47800 | 75600 | 115000 |
| Cmax (ng/mL) | - | 1960 | 3770 | 3860 | - | 3150 | 4370 | 6650 |
| Toxicokinetics (week 26)[3] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 66800 | 105000 | 135000 | - | 132000 | 193000 | 292000 |
| Cmax (ng/mL) | - | 4410 | 8040 | 8480 | - | 9400 | 12300 | 18500 |
| Died/Sacrificed Moribund | - | - | - | - | - | - | - | - |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Toxicity Study, Rat (Continued)** **Report No.: R-9678**

| Daily Dose [mg/kg] | 0 | 100 | 300 | 1000 | 0 | 100 | 300 | 1000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gender** | **M** | **M** | **M** | **M** | **F** | **F** | **F** | **F** |
| Noteworthy Findings | | | | | | | | |
| Body Weight [b] (% of control; d181) | 532 g | -2.5 | +0.7 | -3.3 | 278 g | +1.3 | -1.4 | -0.7 |
| Body weight gain | - | (↓) | (↓) | (↓) | - | - | - | - |
| Food Consumption [b] (% of control; d118-126) | 24.06 g | -10 (↓) | - 6.2 (↓) | -19 (↓) | - | - | - | - |
| Water Consumption | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical Observations | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serum Chemistry | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ Weights[c] (% of control) | | | | | | | | |
| Prostate | 917.49 mg | -61 ** | -74 ** | -76 ** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Testes | 3958.14 mg | -15 ** | -16 ** | -17 ** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Epididymides | 1700.29 mg | -32 ** | -38 ** | -42 ** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Gross Pathology | | | | | | | | |
| Number examined | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 10 | 10 | 9 |
| small prostate | 0 | 10 | 10 | 10 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| small seminal vesicles | - | 10 | 10 | 9 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| lesser extent epididymides | - | 1 | 2 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Histopathology | | | | | | | | |
| Number examined | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 10 | 10 | 9 |
| Prostate | | | | | | | | |
| Atrophy | | | | | | | | |
| +++ | 0 | 4 | 1 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++++ | 0 | 6 | 9 | 10 | N/A | N/A | N/A | N/A |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 26-Week Toxicity Study, Rat (Continued)** **Report No.: R-9678**

| Daily Dose [mg/kg] | 0 | 100 | 300 | 1000 | 0 | 100 | 300 | 1000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gender** | **M** | **M** | **M** | **M** | **F** | **F** | **F** | **F** |
| Seminal vesicle | | | | | | | | |
| Atrophy | | | | | | | | |
| ++++ | 0 | 9 | 10 | 10 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Epididymides | | | | | | | | |
| Decreased tubular diameter | | | | | | | | |
| ++ | 0 | 10 | 10 | 10 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Mammary gland | | | | | | | | |
| Atrophy | | | | | | | | |
| + | 0 | 5 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ++ | 0 | 2 | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pituitary gland | | | | | | | | |
| Increased vacuolation, anterior lobe | | | | | | | | |
| + | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Recovery [d] | | | | | | | | |
| Number Evaluated | 5 | - | - | 5 | 5 | - | - | 5 |

- No noteworthy findings (↓) : decreased tendency M: male F: female
N/A: not applicable [a] recovery animals
Statistical analysis: ** p < 0.01 (Dunnett-test)
+: minimal, ++: mild, +++: moderate, ++++: marked
[1] (*S,R*)-darolutamide [2] (*S,S*)-darolutamide [3] darolutamide

b At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

c For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

d Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Recovery' were fully reversible

## 2.6.7.7.3 イヌを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験

| | |
|---|---|
| Report Title: | ORM-15674: 28 Day Oral (Gavage) Toxicity Study in Dogs |
| Report No.: | R-9667 |
| Location in CTD: | 4.2.3.2.8 |
| Test Article: | darolutamide |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Species/Strain: | Beagle Dog | Study No.: | 518001 |
| Initial age: | approximately 13 to 14 months | GLP compliance: | Yes |
| Duration of Dosing: | 28 days | Date of 1st dose: | [redacted] |
| Duration of Postdose: | - | | |
| Method of Administration: | Oral gavage (once daily) | | |
| Vehicle/Formulation: | 0.5% (w/v) aqueous methylcellulose with 0.5% (v/v) Tween 80 | | |
| Special features: | - | | |
| NOAEL | 800 mg/kg/day | | |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 28-Day Toxicity Study, Dog** **Report No.: R-9667**

| **Daily Dose [mg/kg]**<br>**Gender** | **0 (Control)**<br>**M** | **50**<br>**M** | **200**<br>**M** | **800**<br>**M** |
|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Toxicokinetics (Day 28) for darolutamide | | | | |
| No. of Animals/Time Point | 4 | 4 | 4 | 4 |
| AUC (ng*h/mL) | - | 71000 | 157200 | 162200 |
| Cmax (ng/mL) | - | 5030 | 9300 | 9990 |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 28-Day Toxicity Study, Dog (Continued)** **Report No.: R-9667**

| Daily Dose [mg/kg] | 0 (Control) | 50 | 200 | 800 |
|---|---|---|---|---|
| Gender | M | M | M | M |
| Noteworthy Findings | | | | |
| Died/Sacrificed Moribund | - | - | - | - |
| Body Weight [a] (% of control) | 10.8 kg | - 5.6 | - 8.3 | - 9.3 |
| Body Weight gain (kg, days 0-28) | + 0.2 | - 0.2 * | - 0.3 * | - 0.6 *** |
| Food Consumption | - | - | (↓) | (↓) |
| Clinical Observations | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - |
| Electrocardiography | - | - | - | - |
| Haematology | - | - | - | - |
| Serum Chemistry | - | - | - | - |
| Urinalysis | - | - | - | - |
| Organ Weights [b] (% of control) | | | | |
| Prostate (abs) | 13.48 g | - 78.3*** | - 81.8*** | - 79.4*** |
| Epididymides (abs) | 3.87 g | - 24.3* | - 35.7** | - 31.8** |
| Thymus (abs) | 7.09 g | +0.4 | - 15.4 | - 34.4 |
| Gross Pathology | | | | |
| Number examined | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | - | - | - | - |
| Histopathology | | | | |
| Number examined | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Epididymis | | | | |
| Oligospermia | | | | |
| + | 0 | 1 | 0 | 1 |
| ++ | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Vacuolation of epididymal epithelium | | | | |
| + | 0 | 1 | 1 | 0 |
| ++ | 0 | 1 | 3 | 4 |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 28-Day Toxicity Study, Dog (Continued)** **Report No.: R-9667**

| Daily Dose [mg/kg] | 0 (Control) | 50 | 200 | 800 |
|---|---|---|---|---|
| Gender | M | M | M | M |
| Prostate | | | | |
| Atrophy, diffuse | | | | |
| + | 0 | 1 | 0 | 0 |
| +++ | 0 | 3 | 4 | 4 |

- : No noteworthy findings (↓): decreased tendency M: male
Statistical analysis: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (ANOVA)
+: minimal, ++: mild, +++: moderate
a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights

## 2.6.7.7.4 イヌを用いた 4 週間の回復性評価を含む 13 週間反復経口投与毒性試験

Report Title: ODM-201: 13-week oral (gavage) toxicity study in the beagle dog followed by a 4-week treatment-free period
Report No.: R-9672
Location in CTD: 4.2.3.2.9
Test Article: darolutamide

Species/Strain: Beagle dog
Initial age: 12 or 13 months
Duration of Dosing: 13 weeks
Duration of Postdose: 4 weeks
Method of Administration: Oral gavage (twice daily)
Vehicle/Formulation: 0.5 % (w/v) aqueous methylcellulose with 0.5 % (v/v) Tween 80
Special features: -
NOAEL 400 mg/kg/day

Study No.: AB14462
GLP compliance: Yes
Date of 1st dose: [redacted]

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 13-Week Toxicity Study, Dog** **Report No.: R-9672**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 50 M | 150 M | 400 M | 0 (Control) F | 50 F | 150 F | 400 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | 4 +2[a] | 4 | 4 | 4 +2[a] | 4 +2[a] | 4 | 4 | 4 +2[a] |
| No. of Animals/Time Point | 4 +2[a] | 4 | 4 | 4 +2[a] | 4 +2[a] | 4 | 4 | 4 +2[a] |
| Toxicokinetics (13 week)[1] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 77576 | 106992 | 103295 | - | 82537 | 108579 | 144374 |
| Cmax (ng/mL) | - | 4248 | 5448 | 5305 | - | 4060 | 6190 | 7042 |
| Toxicokinetics (13 week)[2] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 8252 | 7524 | 12518 | - | 9860 | 11898 | 21215 |
| Cmax (ng/mL) | - | 529 | 599 | 815 | - | 719 | 826 | 1391 |
| Toxicokinetics (13 week)[3] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 85828 | 114517 | 115813 | - | 92397 | 120477 | 165589 |
| Cmax (ng/mL) | - | 4713 | 6006 | 6028 | - | 4721 | 6973 | 8346 |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 13-Week Toxicity Study, Dog (Continued)** **Report No.: R-9672**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 50 M | 150 M | 400 M | 0 (Control) F | 50 F | 150 F | 400 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Noteworthy Findings | | | | | | | | |
| Died/Sacrificed Moribund | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Body Weight | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Body Weight gain (mean % gain) | +7.01 | +1.86 | +1.33 | +3.90 | +5.33 | +4.49 | +5.82 | -1.46 |
| Food Consumption | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical Observations | | | | | | | | |
| white colored feces | - | - | - | ccasionally | - | - | - | ccasionally |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Electrocardiography | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arterial blood pressure | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Haematology | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Serum Chemistry | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ Weights (relative weight,%t) | | | | | | | | |
| Number of animals | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Epididymides | 0.04443 | 0.02978* | 0.03960* | 0.02828** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Prostate | 0.06945 | 0.02263* | 0.02663* | 0.02045* | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Kidney | 0.51448 | 0.51120 | 0.48210 | 0.40515** | 0.42353 | 0.46333 | 0.48588 | 0.46973 |
| Gross Pathology | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology | | | | | | | | |
| Number examined | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Epidimymides | | | | | | | | |
| Decreased tubular diameter | | | | | | | | |
| ++ | 0 | 4 | 4 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| +++ | 0 | 0 | 0 | 3 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Epithelial atrophy | | | | | | | | |
| ++ | 0 | 2 | 3 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| +++ | 0 | 2 | 0 | 3 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++++ | 0 | 0 | 1 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 13-Week Toxicity Study, Dog (Continued)** **Report No.: R-9672**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 50 M | 150 M | 400 M | 0 (Control) F | 50 F | 150 F | 400 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Prostate Gland | | | | | | | | |
| Atrophy | | | | | | | | |
| ++++ | 0 | 4 | 4 | 4 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Recovery | | | | | | | | |
| Histopathology | | | | | | | | |
| Number Evaluated | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Epidimymides | | | | | | | | |
| Decreased tubular diameter | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 0 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Epithelial atrophy | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 0 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Prostate Gland | | | | | | | | |
| Atrophy | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 0 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |

- : No noteworthy findings N/A: not applicable M: male F: female a: recovery animals
Statistical analysis: * p < 0.05, ** p < 0.01 (Dunnett-test)
+: minimal, ++: mild, +++: moderate, ++++: marked
[1] (*S,R*)-darolutamide [2] (*S,S*)-darolutamide [3] darolutamide

## 2.6.7.7.5 イヌを用いた 8 週間の回復性評価を含む 39 週間反復経口投与毒性試験

Report Title: ODM-201: 39-week oral (gavage) toxicity study in the Beagle dog followed by an 8-week treatment-free period.
Report No.: R-9679
Location in CTD: 4.2.3.2.10
Test Article: darolutamide

Species/Strain: Beagle Dog
Initial age: 11 months
Duration of Dosing: 39 weeks
Duration of Postdose: 8 weeks
Method of Administration: Oral gavage (twice daily)
Vehicle/Formulation: 0.5 % (w/v) aqueous methylcellulose with 0.5 % (v/v) Tween 80
Special features: -
NOAEL 400 mg/kg/day

Study No.: AB19526
GLP compliance: Yes
Date of 1st dose: [redacted]

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 39-Week Toxicity Study, Dog** **Report No.: R-9679**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 50 M | 150 M | 400 M | 0 (Control) F | 50 F | 150 F | 400 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of Animals | 4+2[a] | 4 | 4 | 4+2[a] | 4+2[a] | 4 | 4 | 4+2[a] |
| No. of Animals/Time Point | 4+2[a] | 4 | 4 | 4+2[a] | 4+2[a] | 4 | 4 | 4+2[a] |
| Toxicokinetics (week 39 )[1] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 8900 | 93100 | 186000 | - | 71500 | 132000 | 199000 |
| Cmax (ng/mL) | - | 4610 | 5090 | 10600 | - | 3940 | 7260 | 11000 |
| Toxicokinetics (week 39 )[2] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 7600 | 9840 | 19200 | - | 6660 | 13400 | 18700 |
| Cmax (ng/mL) | - | 520 | 752 | 1450 | - | 468 | 935 | 1450 |
| Toxicokinetics (week 39 )[3] | | | | | | | | |
| AUC (ng*h/mL) | - | 96700 | 103000 | 206000 | - | 78100 | 145000 | 217000 |
| Cmax (ng/mL) | - | 5130 | 5800 | 12100 | - | 4340 | 8190 | 12400 |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 39-Week Toxicity Study, Dog (Continued)** **Report No.: R-9679**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 50 M | 150 M | 400 M | 0 (Control) F | 50 F | 150 F | 400 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Noteworthy Findings | | | | | | | | |
| Died/Sacrificed Moribund | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Body Weight (% of control)[b] d273 | 10.07 kg | -4.9 | -10.6 ** | -11.9 | 7.47 kg | +1.7 | +2.4 | -4.4 |
| Body weight gain (days 0 – 273; %) | +15 | +5.5 | +2.0 | +6.6 | - | - | - | - |
| Food Consumption | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical Observations | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Electrocardiography | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arterial blood pressure | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Haematology (week 39) | | | | | | | | |
| Red blood cell count (T/L) | 7.140 | 7.040 | 6.723 | 6.177** | 7.570 | 7.498 | 6.878 | 6.488* |
| Haemoglobin (g/L) | 156.5 | 164.8 | 157.3 | 146.2 | 171.8 | 174.5 | 161.8 | 158.6 |
| Packed cell volume (%) | 47.70 | 49.13 | 47.23 | 44.00* | 52.10 | 51.88 | 48.45 | 47.16 |
| Serum Chemistry | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ Weights | | | | | | | | |
| Number examined | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Epididymides (abs. g) | 3.45 | 2.24** | 2.22** | 2.17** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Prostate (abs. g) | 8.73 | 1.72** | 1.57** | 1.32** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Testes (relative BW %) | 0.13 | 0.14 | 0.15* | 0.16** | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Spleen (abs. g) | 149.85 | 95.16** | 89.45** | 91.99** | 113.61 | 99.24 | 90.10 | 72.21 |
| Gross Pathology | | | | | | | | |
| Number examined | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Prostate: small | 0 | 3 | 4 | 4 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Epididymides: small | 1 | 2 | 2 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Testes: enlarged | 0 | 1 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 39-Week Toxicity Study, Dog (Continued)** **Report No.: R-9679**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 50 M | 150 M | 400 M | 0 (Control) F | 50 F | 150 F | 400 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Histopathology | | | | | | | | |
| Number examined | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Epididymides | | | | | | | | |
| Reduced sperm content | | | | | | | | |
| ++ | 0 | 2 | 3 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| +++ | 0 | 2 | 0 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++++ | 0 | 0 | 1 | 3 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Decreased tubular diameter | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 1 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 4 | 1 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| +++ | 0 | 0 | 2 | 3 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Increased tubular diameter, efferent ducts | | | | | | | | |
| + | 0 | 2 | 1 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 1 | 0 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Atrophy epithelial | | | | | | | | |
| ++ | 0 | 2 | 2 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| +++ | 0 | 2 | 2 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++++ | 0 | 0 | 0 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Prostate | | | | | | | | |
| Atrophy | | | | | | | | |
| ++++ | 0 | 4 | 4 | 4 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Testes | | | | | | | | |
| Dilatation, tubular luminal | | | | | | | | |
| + | 0 | 1 | 0 | 3 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Degeneration/atrophy, tubular | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 0 | 0 | 3 | N/A | N/A | N/A | N/A |

**Test Article:** darolutamide

**Repeat-Dose Toxicity - 39-Week Toxicity Study, Dog (Continued)** **Report No.: R-9679**

| Daily Dose [mg/kg] Gender | 0 (Control) M | 50 M | 150 M | 400 M | 0 (Control) F | 50 F | 150 F | 400 F |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sperm accumulation, tubular luminal | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 1 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Granulomatous inflammation, tubular | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| ++ | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Hypertrophy, Leydig cell | | | | | | | | |
| + | 0 | 0 | 2 | 2 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Hypospermatogenesis | | | | | | | | |
| + | 1 | 0 | 2 | 0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Recovery [c] | | | | | | | | |
| Gross Pathology | | | | | | | | |
| Number Evaluated | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Prostate: small | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Histopathology | | | | | | | | |
| Number Evaluated | 2 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Testes | | | | | | | | |
| Hypospermatogenesis | | | | | | | | |
| ++ | 1 | 0 | 0 | 1 | N/A | N/A | N/A | N/A |

- No noteworthy findings N/A: not applicable M: male F: female abs: absolute
Statistical analysis: * p < 0.05, ** p < 0.01 (Dunnett-test), +: minimal, ++: mild, +++: moderate, ++++: marked
[a] recovery animals
[b] At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
[c] Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible
[1] (*S,R*)-darolutamide, [2] (*S,S*)-darolutamide, [3] darolutamide

## 2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

### 2.6.7.8.1 サルモネラ菌を用いた復帰突然変異試験

| | |
|---|---|
| Report Title: | ORM-15674: SALMONELLA TYPHIMURIUM REVERSE MUTATION ASSAY |
| Report No.: | R-9724 |
| Location in CTD: | 4.2.3.3.1.1 |
| Test Article: | darolutamide |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Test for Induction of: | Point mutations | Study No.: | 1341900 |
| Strains: | S. typhimurium: TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100, TA 102 | GLP Compliance: | Yes |
| No. of Independent Assays: | 2 | Date of Treatment: | [redacted] |
| No. of Replicate Cultures: | 3 | | |
| No. of Cells Analyzed/Culture: | > $10^8$ | | |
| Metabolizing System: | Phenobarbital/β-Naphthoflavone induced 10% rat liver S9 | | |
| Vehicle for test compound: | DMSO | | |
| Vehicle for Positive Controls: | Deionised water for NaN3 and MMS, DMSO for 4-NOPD and 2-AA | | |
| Treatment: | plate incorporation and pre-incubation | | |
| Cytotoxic Effects: | Starting at 2500 µg per plate and above with/without S9 | | |
| Genotoxic Effects | negative | | |

**Test Article:** darolutamide

**Genotoxicity *in vitro* - Salmonella microsome assay** **Report No.: R-9724**

| Without Activation | Test Article | Concentration [µg/plate] | Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535 | TA 1537 | TA 98 | TA 100 | TA 102 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Plate Incorporation | DMSO | 0 | 16 | 12 | 27 | 126 | 335 |
| | darolutamide | 3 | 14 | 11 | 26 | 122 | 309 |
| | | 10 | 14 | 14 | 26 | 119 | 322 |
| | | 33 | 13 | 11 | 23 | 124 | 380 |
| | | 100 | 13 | 12 | 23 | 126 | 352 |
| | | 333 | 13 | 12 | 28 | 118 | 306 |
| | | 1000 | 13 | 13 | 29 | 119 | 299 |
| | | 2500[a] | 10 | 10 | 21 | 98 | 323 |
| | | 5000[a] | 0 | 3 | 16 | 64 | 339 |
| | $NaN_3$ | 10 | 1702 | | | 1931 | |
| | 4-NOPD | 10 | | | 316 | | |
| | 4-NOPD | 50 | | 68 | | | |
| | MMS | 3 [µL/plate] | | | | | 4605 |
| Pre-Incubation | DMSO | 0 | 16 | 16 | 26 | 120 | 321 |
| | darolutamide | 3 | 15 | 15 | 23 | 139 | 334 |
| | | 10 | 14 | 15 | 22 | 123 | 358 |
| | | 33 | 14 | 12 | 21 | 124 | 319 |
| | | 100 | 18 | 16 | 22 | 117 | 344 |
| | | 333 | 14 | 16 | 24 | 104 | 373 |
| | | 1000 | 10 | 15 | 23 | 113 | 336 |
| | | 2500[a] | 5 | 5 | 15 | 79 | 289 |
| | | 5000[a] | 4 | 2 | 3 | 70 | 294 |
| | $NaN_3$ | 10 | 1663 | | | 1708 | |
| | 4-NOPD | 10 | | | 465 | | |
| | 4-NOPD | 50 | | 76 | | | |
| | MMS | 3 [µL/plate] | | | | | 2389 |

**Test Article:** darolutamide

**Genotoxicity in vitro - Salmonella microsome assay (Continued)** **Report No.: R-9724**

| With Activation | Test Article | Concentration [µg/plate] | Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535 | TA 1537 | TA 98 | TA 100 | TA 102 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Plate Incorporation | DMSO | 0 | 17 | 14 | 39 | 127 | 368 |
| | darolutamide | 3 | 18 | 21 | 40 | 133 | 418 |
| | | 10 | 20 | 16 | 30 | 129 | 458 |
| | | 33 | 20 | 17 | 36 | 145 | 442 |
| | | 100 | 16 | 21 | 30 | 130 | 386 |
| | | 333 | 18 | 14 | 41 | 129 | 373 |
| | | 1000 | 22 | 16 | 39 | 127 | 373 |
| | | 2500[a] | 14 | 5 | 25 | 90 | 438 |
| | | 5000[a] | 8 | 5 | 17 | 53 | 345 |
| | 2-AA | 2.5 | 346 | 452 | 2252 | 2554 | |
| | 2-AA | 10 | | | | | 1776 |
| Pre-Incubation | DMSO | 0 | 26 | 21 | 46 | 140 | 396 |
| | darolutamide | 3 | 22 | 19 | 39 | 129 | 414 |
| | | 10 | 26 | 22 | 47 | 144 | 365 |
| | | 33 | 18 | 23 | 39 | 139 | 373 |
| | | 100 | 24 | 22 | 39 | 130 | 372 |
| | | 333 | 23 | 13 | 47 | 134 | 404 |
| | | 1000 | 24 | 20 | 34 | 146 | 465 |
| | | 2500a | 19 | 13 | 34 | 100 | 350 |
| | | 5000a | 9 | 3 | 8 | 77 | 95 |
| | 2-AA | 2.5 | 345 | 280 | 2124 | 2612 | |
| | 2-AA | 10 | | | | | 1592 |

[a] : Precipitation
DMSO : dimethyl sulfoxide
$NaN_3$ : sodium azide
2-AA : 2-aminoanthracene
MMS : methyl methane sulfonate
4-NOPD : 4-nitro-o-phenylene-diamine

## 2.6.7.8.2 ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験

| | |
|---|---|
| Report Title: | ODM-201: CHROMOSOME ABERRATION TEST IN HUMAN LYMPHOCYTES *IN VITRO* |
| Report No. | R-9725 |
| Location in CTD: | 4.2.3.3.1.2 |
| Test Article: | darolutamide |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Test for Induction of: | Chromosome Aberrations | Study No.: | 1487800 |
| Strains: | Human peripheral blood lymphocytes | GLP Compliance: | yes |
| No. of Independent Assays: | 5 | Date of dosing: | [redacted] |
| No. of Replicate Cultures: | 2 | | |
| No. of Cells Analyzed/Culture: | ≥100 | | |
| Metabolizing System: | Phenobarbital/β-naphthoflavone induced 10% rat liver S9 | | |
| Vehicle for test compound: | DMSO | | |
| Vehicle for Positive Controls: | | | |
| Ethyl methane sulfonate (EMS) | Nutrient medium | | |
| Cyclophosphamide | Saline (0.9 % NaCl [w/v]) | | |
| Treatment: | 4 hours and 22 hours | | |
| Cytotoxic Effects: | Without S9 mix cytotoxic effects were observed at 400.0 µg/mL after 4 hours treatment.<br>With S9 mix cytotoxic effects were observed at 340.0 µg/mL and above after 4 hours treatment. | | |
| Rational for Selection of Concentrations: | Cytotoxicity, precipitation or evaluability | | |
| Precipitation in the medium: | ≥ 325 µg/mL (only 4 hours treatment without S9 mix) | | |
| Genotoxic Effects: | Yes | | |

**Test Article:** darolutamide

**Genotoxicity *in vitro* - Cytogenetics *in vitro* assay** **Report No.: R-9725**

| Test Article | Concentration [µg/mL] | Activation | Treatment Time/ Time of Harvest [h] | Metaphases with Aberrations excl Gaps [%] |
|---|---|---|---|---|
| Solvent Control | 0 (DMSO) | - | 4/18 | 2.5 |
| darolutamide | 130.6 | - | 4/18 | 1.5 |
| | 228.6 | - | 4/18 | 5.0 |
| | 400.0 | - | 4/18 | 6.3* |
| EMS | 825.0 | - | 4/18 | 17.0* |
| Solvent Control | 0 (DMSO) | - | 4/18 | 0.5 |
| darolutamide | 100.0 | - | 4/18 | 1.5 |
| | 200.0 | - | 4/18 | 3.5* |
| | 225.0 | - | 4/18 | 4.0* |
| | 250.0 | - | 4/18 | 6.0* |
| | 275.0 | - | 4/18 | 6.0* |
| | 300.0 | - | 4/18 | 13.0* |
| | 325.0[a] | - | 4/18 | 11.0* |
| | 350.0[a] | - | 4/18 | 12.5* |
| | 375.0[a] | - | 4/18 | 10.5* |
| EMS | 770.0 | - | 4/18 | 8.0* |
| Solvent Control | 0 (DMSO) | - | 22/22 | 0.5 |
| darolutamide | 24.4 | - | 22/22 | 0.5 |
| | 42.6 | - | 22/22 | 1.5 |
| | 74.6 | - | 22/22 | 1.5 |
| EMS | 770.0 | - | 22/22 | 28.5* |

**Test Article: d**arolutamide

**Genotoxicity *in vitro* - Cytogenetics *in vitro* assay (Continued)** **Report No.: R-9725**

| Test Article | Concentration [µg/mL] | Activation | Treatment Time/ Time of Harvest [h] | Metaphases with Aberrations excl Gaps [%] |
|---|---|---|---|---|
| Solvent Control | 0 (DMSO) | + | 4/18 | 0.5 |
| darolutamide | 74.6 | + | 4/18 | 2.0 |
| | 130.6 | + | 4/18 | 1.0 |
| | 228.6 | + | 4/18 | 2.0 |
| Cyclophosphamide | 15.0 | + | 4/18 | 14.0* |
| Solvent Control | 0 (DMSO) | + | 4/18 | 1.0 |
| darolutamide | 100.0 | + | 4/18 | 1.5 |
| | 200.0 | + | 4/18 | 1.0 |
| | 250.0 | + | 4/18 | 10.0* |
| Cyclophosphamide | 7.5 | + | 4/18 | 13.5* |
| Solvent Control | 0 (DMSO) | + | 4/18 | 0.5 |
| darolutamide | 200.0 | + | 4/18 | 1.5 |
| | 240.0 | + | 4/18 | 4.0* |
| | 260.0 | + | 4/18 | 4.5* |
| | 340.0 | + | 4/18 | 9.5* |
| Cyclophosphamide | 15.0 | + | 4/18 | 10.5* |

EMS: ethylmethane sulfonate
DMSO: dimethyl sulfoxide
[a] : Precipitation
* : $p < 0.05$ (Fisher's exact test)

## 2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

### 2.6.7.9.1 ラット骨髄小核試験

| | |
|---|---|
| Report Title : | ODM-201: Combined bone marrow micronucleus test and Comet assay in the liver and duodenum in treated male Han Wistar rats |
| Report No.: | R-9674 |
| Location in CTD: | 4.2.3.3.2.1 |
| Test Article: | darulotamide |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Test for Induction of: | Bone marrow micronuclei | Study No.: | 8278571 |
| Treatment schedule: | 3 times, 48, 24 and 3 hours before necropsy | GLP Compliance: | yes |
| Species/Strain/Sex: | Rat/ Wistar/male | Date of dosing: | [redacted] |
| Age: | 8 - 9 weeks | | |
| Method of Administration: | oral gavage | | |
| Sampling time: | 3 hours after 3rd administration | | |
| Cells Evaluated: | Polychromatic erythrocytes | | |
| Number of Cells Analyzed /Animal: | 2000 | | |
| Vehicle/Formulation: | 100% Labrasol® | | |
| Toxic/Cytotoxic Effects | None | | |
| Genotoxic Effects: | None | | |
| Evidence of Exposure: | Toxicokinetics | | |

**Test Article:** darolutamide

**Genotoxicity *in vivo* - Micronucleus Test** **Report No.: R-9674**

| Test Article | Dose [mg/kg] | Number of Animals | Number of Evaluated PCE | PCE [%] | Mean MN/PCE [% ± SD] |
|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 0 | 6 | 12000 | 43.90 | 0.17 ± 0.12 |
| darolutamide | 100 | 6 | 12000 | 44.00 | 0.14 ± 0.17 |
| | 500 | 6 | 12000 | 46.57 | 0.21 ± 0.17 |
| | 1000 | 6 | 12000 | 49.80 | 0.20 ± 0.09 |
| EMS | 150 | 6 | 12000 | 44.70 | 2.33 ± 0.19** |
| Untreated | - | 6 | 12000 | 47.17 | 0.24 ± 0.19 |

** : P < 0.01 (Wilcoxon)
EMS: ethyl methanesulfonate, PCE: Polychromatic erythrocytes
MN: Micronucleated, SD : standard deviation

## 2.6.7.9.2 ラット肝臓コメット試験

Report Title : ODM-201: Combined bone marrow micronucleus test and Comet assay in the liver and duodenum in treated male Han Wistar rats
Report No.: R-9674
Location in CTD: 4.2.3.3.2.1
Test Article: darolutamide

| | | | |
|---|---|---|---|
| Test for Induction of: | Primary DNA damage in the liver | Study No.: | 8278571 |
| Treatment schedule: | 3 times, 48, 24 and 3 hours before necropsy | GLP Compliance: | yes |
| Species/Strain/Sex: | Rat/ Wistar/male | Date of dosing: | [redacted] |
| Age: | 8 - 9 weeks | | |
| Method of Administration: | oral gavage | | |
| Sampling time: | 3 hours after 3rd administration | | |
| Cells Evaluated: | Liver tissue, single cell suspensions | | |
| Number of Cells Analyzed /Animal: | 100 | | |
| Vehicle/Formulation: | 100% Labrasol® | | |
| Toxic/Cytotoxic Effects | None | | |
| Genotoxic Effects: | None | | |
| Evidence of Exposure: | Toxicokinetics | | |

**Test Article:** darolutamide

**Genotoxicity *in vivo* - Comet Assay in Liver** **Report No.: R-9674**

| Test Article | Dose [mg/kg] | Number of Evaluated Cells | Tail Intensity [% ± SEM] | Tail Moment [% ± SEM] | Mean Clouds [%] | Mean Cells with Halos [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 0 | 600 | 3.13 ± 0.71 | 0.37 ± 0.10 | 16.15 | 3.00 |
| darolutamide | 100 | 600 | 4.24 ± 0.49 | 0.48 ± 0.07 | 15.46 | 3.67 |
| | 500 | 600 | 4.09 ± 0.68 | 0.49 ± 0.08 | 20.79 | 5.50 |
| | 1000 | 600 | 2.92 ± 0.63 | 0.35 ± 0.08 | 13.97 | 1.67 |
| EMS | 150 | 600 | 40.84 ± 1.44 | 8.83 ± 0.42 | 22.42 | 5.00 |
| Untreated | - | 600 | 1.56 ± 0.76 | 0.17 ± 0.08 | 15.63 | 1.67 |

EMS: ethyl methanesulfonate, SEM: standard error of mean

## 2.6.7.9.3 ラット十二指腸コメット試験

| | |
|---|---|
| Report Title : | ODM-201: Combined bone marrow micronucleus test and Comet assay in the liver and duodenum in treated male Han Wistar rats |
| Report No.: | R-9674 |
| Location in CTD: | 4.2.3.3.2.1 |
| Test Article: | darolutamide |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Test for Induction of: | Primary DNA damage in the duodenum | Study No.: | 8278571 |
| Treatment schedule: | 3 times, 48, 24 and 3 hours before necropsy | GLP Compliance: | yes |
| Species/Strain/Sex: | Rat/ Wistar/male | Date of dosing: | [redacted] |
| Age: | 8 - 9 weeks | | |
| Method of Administration: | oral gavage | | |
| Sampling time: | 3 hours after 3rd administration | | |
| Cells Evaluated: | Duodenum tissue, single cell suspensions | | |
| Number of Cells Analyzed /Animal: | 100 | | |
| Vehicle/Formulation: | 100% Labrasol® | | |
| Toxic/Cytotoxic Effects | None | | |
| Genotoxic Effects: | None | | |
| Evidence of Exposure: | Toxicokinetics | | |

**Test Article:** darolutamide

**Genotoxicity *in vivo* - Comet Assay in Duodenum** **Report No.: R-9674**

| Test Article | Dose [mg/kg] | Number of Evaluated Cells | Tail Intensity [% ± SEM] | Tail Moment [% ± SEM] | Mean Clouds [%] | Mean Cells with Halos [%] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 0 | 700 | 4.45 ± 1.00 | 0.45 ± 0.10 | 15.91 | 18.80 |
| darolutamide | 100 | 850 | 3.90 ± 0.91 | 0.39 ± 0.11 | 18.95 | 18.00 |
| | 500 | 900 | 7.82 ± 1.73 | 0.89 ± 0.22 | 22.32 | 18.83 |
| | 1000 | 900 | 4.22 ± 0.39 | 0.40 ± 0.04 | 19.23 | 20.33 |
| EMS | 150 | 900 | 23.72 ± 1.12 | 3.16 ± 0.21 | 21.26 | 17.50 |
| Untreated | - | 850 | 2.86 ± 0.60 | 0.26 ± 0.06 | 17.43 | 17.00 |

EMS: ethyl methanesulfonate, SEM: standard error of mean

**Test Article:** darolutamide

**Toxicokinetics of darolutamide in male rats** **Report No.: R-9674**

| **Dose** | **[mg/kg]** | **0** | **100** | **500** | **1000** |
|---|---|---|---|---|---|
| AUC | [ng·h/mL] | - | 191000 | 339000 | 311000 |
| Cmax | [ng/mL] | - | 15000 | 28300 | 22000 |
| $t_{max}$ | [h] | - | 5.0 | 1.3 | 3.5 |

## 2.6.7.10 がん原性試験

Not applicable

## 2.6.7.11 生殖発生毒性試験：　重要な試験以外の試験

Not applicable

## 2.6.7.12 生殖発生毒性試験：　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Not applicable

## 2.6.7.13 生殖発生毒性試験：　胚・胎児発生に関する試験

Not applicable

## 2.6.7.14 生殖発生毒性試験：　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Not applicable

## 2.6.7.15 新生児を用いた試験

Not applicable

## 2.6.7.16 局所刺激性試験

Not applicable

## 2.6.7.17 その他の毒性試験

**Test Article:** darolutamide

**Other Toxicity Study**

| Study Type | Species/ Strain | Method of Administration | Doses | Noteworthy findings | Location in CTD (Report No.) |
|---|---|---|---|---|---|
| 3T3-NRU phototoxicity test | Mouse fibroblasts (3T3.A31) | *In vitro* | up to 100 µg/mL | Darolutamide was identified as a non-phototoxic compound with a PIF of 1.0. | 4.2.3.7.7.1 (R-9671) |

PIF: photoirritancy factor