Table of Contents

1 非臨床試験計画概略 6
2 薬理試験 9
2.1 効力を裏付ける試験 9
2.1.1 In vitro 薬理試験 9
2.1.2 In vivo 薬理試験 9
2.1.3 薬理作用を検討した非臨床試験における用量選択について 11
2.2 安全性薬理試験 12
3 薬物動態試験 12
4 毒性試験 14
4.1 単回投与毒性試験 14
4.2 反復投与毒性試験 14
4.3 遺伝毒性試験 17
4.4 がん原性試験 17
4.5 生殖発生毒性試験 18
4.6 幼若動物の毒性試験 18
4.7 原薬及び製剤 19
4.8 動物とヒトの曝露量比較 19
5 総括及び結論 20
6 参考文献 25

List of Tables

Table 4.8-1: Luspatercept の無毒性量又は最小毒性量における曝露量とヒト曝露量との比 19

Approved v2.0

List of Figures

Figure 2.1.2-1: 赤血球の分化成熟過程と luspatercept の作用との関係..... 10

Approved v2.0

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
ACE-536、BMS-986346	luspatercept の開発コード番号	
ActRIIB	activin receptor type IIB	アクチビン受容体 IIB 型
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransaminase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
αSMA	alpha smooth muscle actin	α 平滑筋アクチン
AST	aspartate aminotransaminase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the serum concentration-time curve	血清中濃度時間曲線下面積
AUC(0-Xh), AUC(0-Yd)	area under the serum concentration-time curve from time zero to X hours or Y days postdose	投与後 0 時間から X 時間もしくは Y 日までの血清中濃度時間曲線下面積
Baso E	basophilic erythroblast	好塩基性赤芽球
BFU-E	burst forming units-erythroid	赤芽球バースト形成細胞（前期赤芽球系前駆細胞）
BMP	bone morphogenetic protein	骨形成蛋白質
BUN	Blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CFU-E	colony forming units-erythroid	赤芽球コロニー形成細胞（後期赤芽球系前駆細胞）
CH	constant heavy chain	重鎖定常領域
Cmax	maximum serum concentration	最高血清中濃度
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
EPO	erythropoietin	エリスロポエチン
Fc	fragment crystallizable	結晶化フラグメント
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GDF	growth and differentiation factor	増殖分化因子
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	international council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン

Approved v2.0

略号	英語	日本語
LOAEL	Lowest observed adverse effect level	最小毒性量
mAb	monoclonal antibody	モノクローナル抗体
MCH	mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球血色素量
MCV	mean corpuscular volume	平均赤血球容積
MDS	myelodysplastic syndromes	骨髄異形成症候群
NHD13	NUP98-HOXD13	－
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	－
Ortho E	orthochromatic erythroblast	正染性赤芽球
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
Poly E	polychromatic erythroblast	多染性赤芽球
Pro E	proerythroblast	前赤芽球
Q2W	once every two weeks	2 週間に 1 回（投与）
Q3W	once every three weeks	3 週間に 1 回（投与）
RAP-536	luspatercept のマウス相同蛋白質の開発コード番号	
RBC	red blood cell	赤血球
Retic	reticulocyte	網状赤血球
SD	Sprague-Dawley	－
SOC	system organ class	器官別大分類
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TEAE	treatment-emergent adverse event	試験治療下で発現した有害事象
TIM-1	T cell Ig mucin 1	T 細胞 Ig ムチン 1
TGF-β	transforming growth factor beta	トランスフォーミング増殖因子 β
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
Tmax	time to reach maximum serum concentration	最高血清中濃度到達時間
UUL	unilateral ureter ligation	片側尿管結紮

Approved v2.0

1 非臨床試験計画概略

Luspatercept（別名 ACE-536、BMS-986346）は、骨髄異形成症候群（MDS）に伴う貧血の治療薬として開発している、新規作用機序を有する赤血球成熟促進薬である。

主に骨髄内で生じる赤血球産生は複数の調節因子に影響を受けており[1,2]、特に、その調節因子の一種であるトランスフォーミング増殖因子 β（TGF-β）スーパーファミリーは、様々な器官系の発生、分化及び成熟に関与する蛋白質群である[3,4]。TGF-β スーパーファミリーに属するリガンドのいくつかが、アクチビン受容体 IIB 型（ActRIIB）等の受容体を介して細胞内シグナルを惹起することで赤血球産生などの様々な生物活性を調節していることは知られているが[5]、具体的に赤血球産生にどのような影響を及ぼすかについては、研究の余地が残されている[6,7]。TGF-β スーパーファミリーリガンドが ActRIIB を含む複数のアクチビン受容体に相互作用し、骨髄内に存在する造血幹細胞の分化成熟に関与していることが報告されている[7]。特に、増殖分化因子（GDF）11 が嗅覚上皮[8]や網膜[9]における神経発生において負の制御因子として働いていること、また TGF-β スーパーファミリーリガンド（主に GDF11 や GDF8 など）が ActRIIB を含む受容体を介して細胞内シグナルを惹起し、Smad2 及び Smad3（以下、Smad2/3）シグナル経路の活性化を引き起こすことが知られている[10]。また、GDF11 の血中濃度上昇が MDS 患者[11]や MDS と同じく無効造血を特徴とする β サラセミア患者[12]で認められている。さらに、MDS[11] 及び β サラセミア[13]のモデルマウスや MDS 患者の骨髄細胞[14]で Smad2/3 リン酸化レベルの上昇が認められている。

Luspatercept はヒト ActRIIB の細胞外ドメイン（ECD）にヒト免疫グロブリン（Ig）G1 結晶化フラグメント（Fc）ドメイン［ヒンジ領域、重鎖定常領域（CH）2 及び CH3 ドメイン］を結合させた遺伝子組換え融合蛋白質であり、さらに、ECD を改変することでリガンド結合性を改善している。この ECD 改変はリガンド結合部位にアミノ酸変異（L79D）を、また蛋白質の両末端にトランケーション変異を導入することで行っている。本改変によって、luspatercept はアクチビン A に対する結合親和性が低くなり、骨形成や生殖系に対するアクチビン A の作用[15,16]に影響を及ぼさないことが期待できる。

Luspatercept は GDF11 及びその他の TGF-β スーパーファミリーリガンドを捕捉し、アクチビン受容体を介したシグナル伝達活性化を阻害することが示された。このシグナル伝達活性化の阻害により、骨髄内に存在する分化成熟過程の後期段階にある赤血球前駆細胞群[a]の分化成熟が促進され、結果として成熟赤血球数が増加する。Luspatercept の後期赤血球前駆細胞の成熟促進という作用機序は、赤血球前駆細胞の増殖及び生存を直接促進するエリスロポエチン（EPO）などの赤血球刺激因子の作用機序とは異なる。

[a] 一般的に「正赤芽球」と呼ばれる細胞群に相当し、本資料では「後期赤血球前駆細胞」と称する。

Approved v2.0

薬理試験

Luspatercept の作用機序及び薬理作用を明らかにする目的で、正常動物及び疾患モデル動物を用いた一連の非臨床薬理試験を計画した。まず、TGF-β スーパーファミリーリガンドを用いた in vitro 試験である、無細胞系アッセイ［表面プラズモン共鳴（SPR）法］及び細胞内シグナル伝達アッセイ（レポーター遺伝子アッセイ）において luspatercept のリガンド選択性を検討した。次いで、正常マウス、ラット及びカニクイザルを用いて luspatercept の作用機序を、さらに今回の承認申請適応症の病態モデルである NUP98-HOXD13 トランスジェニックマウス（以下、NHD13 マウス）を用いて luspatercept の薬効薬理作用を検討した。なお、NHD13 マウスは末梢血球減少、骨髄異形成、貧血及び過形成又は正形成を示す骨髄におけるアポトーシス増加など、ヒト MDS に極めて類似した病態を有する[17]。

ヒト ActRIIB 蛋白質のアミノ酸配列はげっ歯類、ウサギ及びカニクイザルの配列とほぼ一致しており、ヒトとこれらの各動物種との間で 99%超が同一であることが示された。なお、ヒトとカニクイザルの配列は 100%同一であった。したがって、luspatercept はヒト、カニクイザル及びげっ歯類の TGF-β スーパーファミリーリガンドと同程度の親和性を以て結合すると予測される。さらに、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値といった赤血球パラメータに対する増加作用は、検討したすべての動物種（マウス、ラット及びカニクイザル）で共通して認められた。

げっ歯類を用いた薬理試験の一部では、luspatercept のマウス相同蛋白質である RAP-536 を使用した。RAP-536 の ECD は luspatercept と同一であるが、luspatercept のヒト IgG1 Fc ドメインを RAP-536 ではマウス IgG2a Fc ドメインに置き換えている。RAP-536 のようなマウス相同蛋白質は、luspatercept のようなヒト分子と比較してマウス及びラットにおける免疫原性が一般的に低い。そのため、免疫原性による影響を抑えることが可能となり、長期間に及ぶ薬理試験を比較的容易に実施できる。また、luspatercept と RAP-536 の ECD は同一であるため、これら 2 分子間でリガンド結合の選択性及び親和性に差は生じないと考えられる。

医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 ガイドライン「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」［ICH S6(R1), 2011］で容認されているとおり、luspatercept を用いた独立した安全性薬理試験は実施していない。代わりに、カニクイザルを用いた 1 ヵ月間及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験において、luspatercept の安全性薬理作用（心血管系、呼吸器系及び神経系に対する影響）を評価した。

薬物動態試験

主要な毒性試験で用いた動物種［Sprague-Dawley（SD）ラット、New Zealand White（NZW）ウサギ及びカニクイザル］を用いて、ヒトにおける臨床適応経路と同様の皮下投与により luspatercept の薬物動態（PK）を評価した。サルでは絶対的バイオアベイラビリティについても評価した。トキシコキネティクス（TK）試験において、luspatercept 濃度測定及び抗薬物抗体（ADA）の検出のために、

Approved v2.0

頑健、高感度かつ再現性のある分析法を開発し、バリデーションを実施した。動物における luspatercept の組織分布に関する試験は実施しなかったが、妊娠ラット及び授乳中のラットを用いて luspatercept の胎盤移行及び乳汁移行について評価した。Luspatercept は、その異化が蛋白質分解経路を介して起こり、また、分子量に基づくと腎排泄されないと予測される蛋白質医薬品であることから、動物を用いた代謝及び排泄に関する検討を行わなかった。同様に、luspatercept は高分子量の蛋白質医薬品であるため、チトクローム P450 により代謝される化合物との相互作用を起こす可能性は低いと考えられることから、薬物相互作用に関する検討を行わなかった。

毒性試験

Luspatercept はげっ歯類及びサルのいずれにおいても薬理活性を示すことから、一般毒性を評価する動物種として、げっ歯類には SD ラット、非げっ歯類にはカニクイザルを選択した。毒性試験の計画及び実施は ICH S6 ガイドラインに従い、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかった。また、ICH S6 ガイドラインに従って局所刺激性を反復投与毒性試験で投与部位の検査により評価した結果、luspatercept に関連した影響は認められなかった。

Luspatercept の毒性試験プログラムとして、ラットを用いた最長 3 ヵ月間及びサルを用いた最長 6 ヵ月間の反復投与毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、幼若ラットを用いた毒性試験並びにラットを用いた腎毒性試験を実施した（M2.6.6）。臨床投与経路は皮下投与であるため、試験は主に皮下投与により実施した。投与は 2 週間に 1 回（Q2W）としたが、胚・胎児発生に関する試験では器官形成期に週 1 回、合計 2 回投与した。すべての試験は、ラット腎毒性試験を除いて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守して実施した。

ほとんどの毒性試験で TK を評価した。反復投与毒性試験において曝露量に性差は認められなかった。したがって、本概要文では特に記載のない限り、動物とヒトとの曝露量比の算出に雌雄合算平均値を用いた。TK を評価した毒性試験では ADA の産生も評価し、ADA 産生が曝露量に顕著な影響を及ぼした個体は平均 TK 値の算出から除外した。

Luspatercept の MDS 患者における最大臨床用量は 1.75 mg/kg［3 週間に 1 回投与（Q3W）］である。毒性試験の曝露量と最大臨床用量 1.75 mg/kg Q3W との比を 4.8 項に示す。曝露量比は、最大臨床用量 1.75 mg/kg を投与した被験者における定常状態時の投与後 0 時間から 504 時間までの血清中濃度時間曲線下面積（AUC(0-504h)）推定値 6468 µg•h/mL 及び最高血清中濃度（Cmax）推定値 16.5 µg/mL［1 mg/kg Q3W 投与時の定常状態における AUC(0-21d) の幾何平均値 154 day•µg/mL 及び Cmax の幾何平均値 9.45 µg/mL【M5.3.3.5.4 ACE-536-MPK-008 Table 5.1.5.2-1】から外挿］に基づいて算出した。

Approved v2.0

2 薬理試験

2.1 効力を裏付ける試験

Luspatercept 及び RAP-536 の薬理作用を明らかにする目的で、一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した。なお、ほとんどの in vivo 試験は週 2 回、皮下投与により実施した。

2.1.1 In vitro 薬理試験

ヒトでは TGF-β スーパーファミリーに属するリガンドが 40 種以上存在することが報告されている[18]。TGF-β スーパーファミリーリガンドを対象とした結合能スクリーニング試験において、luspatercept との結合能を SPR 法を用いて評価した。その結果、luspatercept は骨形成蛋白質（BMP）6、アクチビン B、GDF11 及び GDF8 と高い親和性を以て結合するが、他のリガンドとの結合は親和性が低いか、あるいは全く結合しないことが確認された。なお、BMP7、BMP9、BMP10 及びアクチビン A との結合体形成は解離速度が非常に速く、正確な測定ができなかった。

評価対象とする TGF-β スーパーファミリーリガンドに応じて異なる pGL3 ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、各リガンドにより惹起される細胞内シグナル伝達活性化に対する luspatercept の阻害作用を検討した。その結果、luspatercept は GDF11 による Smad2/3 シグナル伝達活性化を阻害し、若干、程度は低くなるものの GDF8 による Smad2/3 シグナル伝達活性化も阻害した。一方、アクチビン B によるシグナル伝達活性化に対する阻害作用は非常に弱く、アクチビン A、BMP6、BMP9 及び BMP10 によるシグナル伝達活性化に対しては阻害作用を示さなかった。

2.1.2 In vivo 薬理試験

赤血球前駆細胞集団に対する luspatercept 及び RAP-536 の作用機序を正常マウスを用いて検討した。RAP-536 を単回皮下投与した後、赤芽球系細胞の細胞表面マーカーである Ter119（グリコホリン A 関連蛋白質）及び CD71（トランスフェリン受容体）でゲーティングしたフローサイトメトリーにより大腿骨及び脛骨由来の骨髄細胞並びに脾臓細胞の解析を行い、赤血球前駆細胞の分化成熟に対する影響を明らかにした。その結果、骨髄では RAP-536 投与による好塩基性赤芽球（Baso E）の減少並びに多染性赤芽球（Poly E）及び正染性赤芽球（Ortho E）の増加が観察され、後期赤血球前駆細胞の分化成熟が促進されることが示唆された。

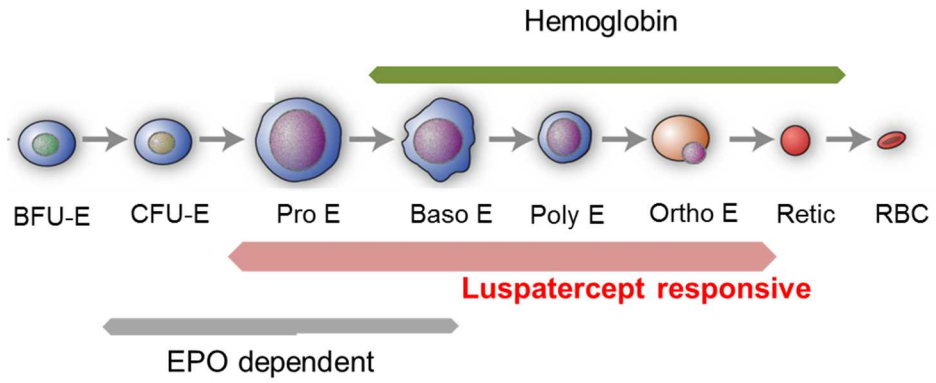
複数の正常動物を用いた試験において、赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）に対する luspatercept 及び RAP-536 の増加作用が顕著かつ速やかに発現し、それらは持続的であることが示された。特にマウスでは、luspatercept による赤血球パラメータに対する作用は用量依存的で、3 及び 10 mg/kg（週 2 回、8 週間皮下投与）における作用は溶媒対照群と比較して統計学的有意であった。

また、luspatercept をマウスに単回腹腔内投与した場合、赤血球パラメータに対する作用は投与後 12 時間以内に発現し、さらにその後も持続した。

Approved v2.0

Luspatercept の赤血球パラメータに対する作用が EPO に依存するか否かを確認する目的で、マウスに luspatercept 及び抗 EPO モノクローナル抗体（mAb）の単独投与に加えて両薬物の併用投与を行った。その結果、luspatercept と抗 EPO mAb を併用投与した場合の赤血球数は、Day 4 に試験を終了した群では増加していたが、Day 7 に試験を終了した群では回復効果が減弱した。したがって、luspatercept による赤血球数増加作用自体は EPO 非依存的に発現する一方で、当該作用を維持するには EPO が必要であることが示唆された。また、以上の結果により、EPO は早期の赤血球成熟過程に対して作用し、luspatercept はより後期の赤血球成熟過程を促進すると考察された（Figure 2.1.2-1）。

Figure 2.1.2-1: 赤血球の分化成熟過程と luspatercept の作用との関係



BFU-E：赤芽球バースト形成細胞（前期赤芽球系前駆細胞）、CFU-E：赤芽球コロニー形成細胞（後期赤芽球系前駆細胞）、Pro E：前赤芽球、RBC：赤血球、Retic：網状赤血球
出典：参考文献 11

さらに、luspatercept と EPO を併用投与した試験では、それぞれの単独投与による赤血球パラメータ増加作用が併用投与により増強されることが確認された。

MDS の動物モデルである NHD13 マウス及び正常マウス（それぞれ 4 ヵ月齢）に RAP-536 を週 2 回皮下投与し、1 ヵ月ごとに赤血球パラメータを評価した。その結果、投与開始後 1 ヵ月の時点ですでに、RAP-536 投与した雄 NHD13 マウスで各赤血球パラメータの統計学的有意な増加が観察された（溶媒対照群との比較）。雌 NHD13 マウスでも赤血球数及びヘマトクリット値の統計学的有意な増加が観察された。また、それ以降も継続して（投与開始後 4 ヵ月間及び 7 ヵ月間）、RAP-536 投与群における赤血球パラメータの統計学的有意な増加が認められた。最長 12 ヵ月間に及ぶ試験期間を通じて NHD13 マウスの生存能を観察した結果、雄では RAP-536 投与による生存期間の改善傾向が認められたものの、概して RAP-536 投与群と溶媒対照群の生存期間は同程度であった。

Approved v2.0

さらに、RAP-536 を投与した NHD13 マウスの脾臓組織検体ではリン酸化 Smad2/3 免疫染色度の増加が抑制されたことから、in vivo の系においても RAP-536 が MDS における異常な Smad2/3 シグナル伝達活性化を減弱することが示唆された。

以上のように、正常動物及び MDS モデルマウスにおいて luspatercept は赤血球パラメータを増加させることが示され、また、その作用機序にも鑑み、本薬が MDS に伴う貧血に対して治療効果を発揮することが期待される。

2.1.3 薬理作用を検討した非臨床試験における用量選択について

毒性試験 WHH00067（M4.2.3.2-3）ではカニクイザルに luspatercept を 0.4、2、10 及び 30 mg/kg の用量で皮下投与（Day 1 及び Day 15 の 2 回）したときの赤血球パラメータに対する作用を検討しており、最低用量の 0.4 mg/kg から発現し 2 mg/kg で最大反応に達する本薬の赤血球パラメータ増加作用が示されている【M2.6.2、2.2.1 項】。この試験では PK の検討も行っており、0.4 及び 2 mg/kg の用量でカニクイザルに皮下投与したとき（Day 15）の AUC(0-336h)はそれぞれ 1169 及び 7006 µg•h/mL であった【M2.6.6、Table 3.2.1-1】。当該用量（0.4 及び 2 mg/kg）における曝露量はヒトに申請用量の本薬を投与したときの曝露量[b]に近いレベルにあることから、これらの用量は本薬のヒトにおける曝露量をサルで再現し、その薬理作用プロファイルを検討する用量として適切なものであると考えられた。一方、複数の薬理試験で採用したマウスでは本薬の血清中濃度測定は行っていないが、被験用量としては上記のカニクイザル毒性試験でも検討された 10 mg/kg（皮下投与）を主に用いている。試験 PPR062 では 10 mg/kg の luspatercept を週 2 回、8 週間反復皮下投与したときのマウスの状態を観察しており、本薬投与による体重減少や死亡、明らかな病的状態の発現は認められなかった。また、10 mg/kg は 1 つ下の用量の 3 mg/kg よりも効力が高かったことから【M2.6.2、Figure 2.2.1.1-1】、薬理試験の目的に鑑み、明らかな毒性が発現せずにより明確に薬理作用を検討できる 10 mg/kg をその後のマウスを用いた薬理試験でも採用した。なお、先述のカニクイザルを用いた毒性試験 WHH00067 においても 10 mg/kg の luspatercept 投与に起因する毒性所見は認められていない【M2.6.2、2.2.1 項】。

申請臨床用量でヒトに投与した時の作用発現に関する考察

MDS 患者を対象とした A536-03 試験で、ヒトに 0.25 mg/kg 及び申請用量 1.0 mg/kg で luspatercept を Q3W で皮下投与したときの 5 回目投与直前（定常状態時）の血清中トラフ濃度の個別値は、それぞれ 0.3～1.54 µg/mL（n = 3）及び 2～3.62 µg/mL（n = 2）の範囲にあったことから【M5.3.5.2.2 A536-03 Final CSR Table 14.3.7.3】、申請用量 1.0 mg/kg で luspatercept の投与を開始し定常状態となった際にはこれらの濃度を上回って本薬が血中に存在すると考えられる。一方、pGL3 ルシフェラーゼ

[b] ヒトに申請用量（1.0 mg/kg、Q3W）の luspatercept を皮下投与し、定常状態となったときの幾何平均 AUC(0-21d)：154 day•µg/mL【M5.3.3.5.4 ACE-536-MPK-008 Table 5.1.5.2-1】を換算した AUC(0-504h)は 3696 µg•h/mL である。

Approved v2.0

レポーター遺伝子アッセイにおけるリガンド依存性シグナル伝達活性化に対する阻害作用【M2.6.2、Table 2.1.2-1】との比較から、上記の臨床用量では本阻害作用を発揮する濃度の目安となる 50%阻害濃度（GDF11：7.1 ng/mL、GDF8：88 ng/mL）を十分に上回る血清中濃度が維持されていることになるが、それにもかかわらず、当該臨床用量（少なくとも、0.25 mg/kg）ではヒトで最大の薬力学的反応には到達していない【M5.3.5.2.2 A536-03 Final CSR Figure 14.2.1.1】。この理由として、①本薬が薬効薬理作用を示すには GDF11 や GDF8 といった主要な標的リガンドの作用を非常に高いレベルで阻害する必要がある、②本薬の作用選択性が低いアクチビン B の作用も一定のレベル以上で阻害する必要がある、③本薬の作用部位である骨髄への移行が何らかの原因で制限されており、骨髄で本薬が薬理作用を発揮するのに必要な薬物濃度に到達するためには循環血における高曝露が必要である、等が推察されるが、いずれもその根拠となるデータを示す試験結果はなく、詳細は不明である。

2.2 安全性薬理試験

Luspatercept を用いた独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、カニクイザルを用いた 1 ヵ月間及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験に安全性薬理作用にかかる評価項目を組み入れて実施した。これらの毒性試験では心血管系機能（心拍数、血圧、体温、心電図）、呼吸器系機能（呼吸数）及び神経系機能（一般状態、行動、運動機能、自己受容性感覚）を評価した。1 ヵ月間反復投与試験（最高用量 30 mg/kg Q2W 皮下投与又は 10 mg/kg Q2W 静脈内投与）及び 3 ヵ月間反復投与試験（最高用量 30 mg/kg Q2W 皮下投与）で評価したいずれの用量においても、これらの評価項目に luspatercept 投与に関連した所見は認められなかった。なお、3 ヵ月間反復投与試験の 30 mg/kg 皮下投与群における定常状態の AUC(0-336h)は 129535 µg•h/mL（雌雄の平均値）であり、これはヒトにおける最大臨床用量である 1.75 mg/kg での推定 AUC(0-21d) 6468 µg•h/mL の 20 倍であった。

3 薬物動態試験

Luspatercept の PK を検討するため、主要な毒性試験で用いた動物種（SD ラット、NZW ウサギ及びカニクイザル）を用いて、ヒトにおける臨床適応経路と同様の単回又は反復皮下投与により、luspatercept の PK を評価した。分布試験については、妊娠ラットを用いて胎盤を介した胎児への移行及び授乳ラットを用いて乳汁移行を評価した。

血清中 luspatercept 濃度測定のために、頑健で再現性のある酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法を開発した。TK 試験における抗 luspatercept 抗体の検出のために、電気化学発光法によるブリッジングイムノアッセイを開発した。いずれの分析バリデーションも、バリデーション実施時の米国 FDA のガイダンス「Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation」（2001 年）及び「Draft Guidance for Industry: Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins」（2009 年）並びに欧州医薬品庁のガイドライン「Guideline on bioanalytical method validation」（2012 年）及び「Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins」（2008 年）に準拠した。

Approved v2.0

いずれの分析法も線形性、感度、回収率、真度及び精度、安定性並びに希釈の妥当性の基準を満たした。

PK パラメータについて、luspatercept を単回静脈内投与（サル）又は皮下投与（ラット、ウサギ及びサル）し、評価した。Luspatercept を単回皮下投与した結果、最高血清中濃度到達時間（Tmax）はラットで約 4 日、ウサギで約 3 日、サルで約 2～3 日であった。いずれの動物種においても、luspatercept の血清中濃度は一次吸収及び一次消失の推移を示した。ラット、ウサギ及びサルにおいて、Cmax 及び血清中濃度時間曲線下面積（AUC）の平均値は、用量にほぼ比例して増加した。クリアランスは用量及び投与経路（皮下又は静脈内投与）に依存しなかった。曝露量に明らかな性差は認められなかった。

反復投与毒性試験における luspatercept の TK は、高感度かつバリデートされた競合的又はサンドイッチ ELISA 法により測定した。Luspatercept の曝露量は SD ラットを用いた 1 及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験、SD ラット及び NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験、カニクイザルを用いた 1、3 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験並びに幼若ラットを用いた毒性試験の一部として評価した。その結果、循環血中における luspatercept の消失半減期は、幼若及び成熟ラットで約 3～9 日、ウサギで約 2～3 日、サルで約 5～8 日であったことから、Q2W 投与で投与期間を通じて持続的な曝露が得られると予測された。Luspatercept の TK プロファイルは線形性を示し、AUC 及び Cmax は用量にほぼ比例して増加し、すべての動物種の雌雄で類似していた。反復皮下投与後の Tmax は、用量に関係なく、ラットで約 2～4 日、ウサギで約 3 日、サルで約 2～3 日であった。サルにおけるクリアランスは、用量及び投与経路に依存しなかった。Q2W 投与による蓄積量は、すべての動物種で約 2 倍であった。

カニクイザルに単回及び反復投与したときの luspatercept のバイオアベイラビリティは、同用量（単回投与：10 mg/kg、反復投与：2 mg/kg）を皮下又は静脈内投与したときの曝露量を比較することにより算出した。その結果、luspatercept の絶対的バイオアベイラビリティは 76%～135%であったことから、皮下投与したときのバイオアベイラビリティは高いことが示された。

妊娠ラット及び妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では、胎児発生の重要な段階での継続的な曝露を確保するため、器官形成期に luspatercept を週 1 回、合計 2 回投与した。その結果、ラット及びウサギで、すべての用量で曝露量（AUC 及び Cmax）が用量依存的に増加した。ラット及びウサギの胎児の血清中に luspatercept が検出された。

動物における luspatercept の組織分布に関する試験は実施しなかったが、SD ラットにおいて luspatercept の胎盤移行及び乳汁移行について評価した。妊娠 SD ラットに luspatercept を単回皮下投与し、投与後 24、48 及び 72 時間における血清中濃度及び乳汁中濃度を測定した。その結果、luspatercept の血清中濃度に対する乳汁中濃度の比は 0.06～0.17 の範囲であり、平均乳汁移行率は 12%であった。

Approved v2.0

SD ラットにおける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で、投与後 8 及び 24 時間における母動物及び胎児の血清中濃度を測定し、luspatercept の胎盤通過について評価した。その結果、母動物血清中濃度に対する胎児血清中濃度の比は、4%～33%であり、平均値は投与後 8 及び 24 時間でそれぞれ 18%及び 9%であった。

Luspatercept に特異的な ADA はラットを用いた一般毒性試験、幼若動物を用いた毒性試験及び胚・胎児発生に関する試験で検出されたが、ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験（63.8%）を除き、その発現頻度は低かった。ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験で、高力価の ADA の産生により luspatercept の血清中濃度が低下したが、他の試験では TK プロファイルに及ぼす影響は認められなかった。また、サルを用いた 1、3 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験で、ADA 陽性率は低かった。サルを用いた 1 及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験で認められた低力価の ADA は、TK プロファイルに影響を及ぼさなかった。一方、6 ヵ月間反復投与毒性試験の Day 183 以降で、ADA 陽性の 1 例の TK プロファイルに影響が認められた。ADA は少数のウサギでも検出され、母動物及び胎児における luspatercept の濃度低下と関連性が認められた。

Luspatercept は、その異化が蛋白質分解経路を介して起こり、また、分子量に基づくと腎排泄されないと予測される蛋白質医薬品であることから、動物を用いた代謝及び排泄に関する検討を行わなかった。同様に、luspatercept は高分子量の蛋白質医薬品であるため、チトクローム P450 により代謝される化合物との相互作用を起こす可能性は低いと考えられることから、薬物相互作用に関する検討を行わなかった。

4 毒性試験

反復投与毒性試験（ラット及びサル）、生殖発生毒性試験（ラット及びウサギ）並びに幼若動物の毒性試験（ラット）を GLP に準拠して実施した。さらに、毒性発現の機序に関する探索的試験として、ラットを用いた探索的腎毒性試験（GLP 非適用）を実施した。

4.1 単回投与毒性試験

Luspatercept の単回投与毒性試験は実施していない。

4.2 反復投与毒性試験

ラットにおいて、1 ヵ月間投与で 60 mg/kg Q2W まで、3 ヵ月間投与で 15 mg/kg Q2W まで、luspatercept の忍容性は良好であった。サルでは、3 ヵ月間皮下投与で 30 mg/kg Q2W まで、1 ヵ月間静脈内投与で 10 mg/kg Q2W まで、6 ヵ月間皮下投与で 6 mg/kg Q2W まで、忍容性は良好であった。

Luspatercept に関連した影響が認められた器官・組織は、心臓及び肺（関連する組織学的所見を伴わない重量減少、ラットのみ）、血液（ラット及びサル）、腎臓（ラット及びサル）、副腎（ラットのみ）、肝臓（ラットのみ）、胃（ラットのみ）、脈絡叢（サルのみ）及び胸腺（ラット及びサル）であった。

Approved v2.0

血液学的所見［概して用量に依存した赤血球パラメータ（赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の増加］が全試験を通してすべての用量で認められた。赤血球パラメータの増加に関連した変化として、網状赤血球数及び赤血球分布幅の増加並びに平均赤血球血色素量（MCH）及び平均赤血球容積（MCV）の減少が認められた。赤血球パラメータの増加は、これらの非臨床動物種における luspatercept の薬理作用と一致したものであった。また、サル 6 ヵ月間投与試験では、すべての用量で下顎及び腋窩リンパ節の髄外造血が認められた。ラットで認められたその他の血液学的変化は、血小板数の減少並びにリンパ球数及び単球数の増加を伴う総白血球数の増加であった。

ラット 1 ヵ月間投与試験では、20 mg/kg 以上の用量で胸腺に軽微な限局性又は多巣性うっ血の発現頻度が増加し、回復期間終了時にも雄で認められた。サル 3 ヵ月間試験では、1 mg/kg 以上で胸腺退縮の発現頻度が増加したが、回復期間終了時には認められず、有害所見ではないと考えられた。

膜性増殖性糸球体腎炎が、ラットでは 6 mg/kg 以上の 1 ヵ月間投与又は 1 mg/kg 以上の 3 ヵ月間投与で雌雄に認められ、サルでは 1 mg/kg 以上の 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間投与で認められた。本所見に関する無毒性量（NOAEL）は、ヒトにおける 1.75 mg/kg Q3W 投与時より低い曝露量に相当した。サル試験では、尿細管及び間質への影響（間質性又は尿細管の出血、間質性線維症、尿細管変性・萎縮など）も主に高用量（3 ヵ月間試験で 30 mg/kg、6 ヵ月間試験で 6 mg/kg）で認められた。腎臓の病理学的所見と関連して、血中尿素窒素（BUN）及びクレアチニンの軽微な増加が認められた。ラット 1 ヵ月間投与では 60 mg/kg で雌にカリウム及び無機リンの増加がみられ、サル 6 ヵ月間投与では尿中アルブミン／クレアチニン比の増加（雌 1 mg/kg 以上、雄 6 mg/kg）も認められた。サル 1 ヵ月間投与では腎臓の組織学的変化は認められなかったが、最高用量の 30 mg/kg で BUN 及びクレアチニンの軽微な増加が認められた。糸球体病変は、反復投与試験の多くで 2 ヵ月間又は 10 週間の回復期間後にも認められた。サル 6 ヵ月間投与試験の 12 週間の回復期間後、腎臓の変化は 1 mg/kg では概して回復したが、6 mg/kg では持続した。

腎障害の進行に対する luspatercept の作用を詳細に検討するため、3 ヵ月間投与腎毒性試験（GLP 非適用）を実施し、2 種類のげっ歯類腎障害モデル［5/6 腎摘出又は片側尿管結紮（UUL）］のいずれかを施したラットに luspatercept（0.5 又は 5 mg/kg Q2W）又は RAP-536（10 mg/kg Q2W）を皮下投与した。Luspatercept 又は RAP-536 を投与した 5/6 腎摘出モデルでは、媒体を投与した 5/6 腎摘出モデル並びに luspatercept 又は RAP-536 を投与したそれぞれの偽手術群と比較して、糸球体及び尿細管間質性病変の増悪、免疫染色での TGF-β シグナル伝達マーカー［phospho Smad2（pSmad2）］及び上皮 - 間葉形質転換マーカー［α 平滑筋アクチン（αSMA）］の増加、腎毒性の尿中バイオマーカー［尿中アルブミン、T 細胞 Ig ムチン 1（TIM-1）、オステオポンチン］の増加が認められた。UUL モデルでは、閉塞性腎症の程度に媒体対照群と luspatercept 及び RAP-536 投与群との間で明らかな差は認められなかった。本試験では TK を測定していないが、luspatercept の最低用量（0.5 mg/kg）群の曝露量は臨床曝露量よりも低いと推定される。

ラット 3 ヵ月間投与試験並びにサル 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間投与試験の対照群及び luspatercept 投与群

Approved v2.0

の一部の腎臓切片について免疫組織化学的検査を実施した結果、変化がみられた個体のほとんどで糸球体病変部に免疫成分の沈着（膜内又はメサンギウム領域における IgG、IgM 又は C3 を含む顆粒状沈着物の増加）が認められた。免疫組織化学的検査所見から免疫複合体沈着が示唆されたが、同様の染色陽性は糸球体損傷後の二次的過程でも認められる。また、腎臓の所見と ADA の血清反応陽性との関連性はサル試験及びラット腎毒性試験のいずれでも認められなかった。これらのことから、腎臓所見への免疫複合体沈着の関与は除外できないが、投与物質による直接的な影響も推定される。したがって、臨床試験では腎機能を綿密にモニタリングしているが、ヒト被験者において腎障害と luspatercept 投与との関連性は認められていない【M2.5、5.3.3.2 項】。

1 mg/kg 以上を 6 ヵ月間投与したサルにおいて、脈絡叢の血管を含む間質に luspatercept に関連した所見が認められた。病理組織学的検査では、血管変性、色素（ヘモジデリン）沈着、好酸性蛋白様物質沈着、混合性炎症性細胞浸潤（少数の好中球、マクロファージ及び形質細胞を含むリンパ球）及び泡沫状（空胞化）マクロファージ浸潤が認められた。免疫組織化学的検査では、脈絡叢の変化を有する luspatercept 投与動物の半数に脈絡叢間質の C3 顆粒増加が認められた。脈絡叢 C3 顆粒の増加は、泡沫状マクロファージによる補体成分の処理の増加を示唆する所見と考えられた。休薬期間終了時では、6 mg/kg 群の雄 1 例のみに軽微な脈絡叢所見が認められた。回復群のいずれの個体にも脈絡叢の活動性炎症及び血管損傷を示す所見は認められず、治癒及び修復が示唆された。これらの脈絡叢の組織学的変化は、カニクイザルに生じることが知られている背景変化[19] と類似しており、脈絡叢の機能への影響はないと推察され[20]、サルにおける中枢神経系関連の臨床症状との関連性はみられなかったことから、有害所見ではないと考えられた。サルにおける脈絡叢所見の臨床的意義は不明であるが、変化は軽微かつ有害でないことから、臨床的有害事象として発現する可能性は低いと考えられる。

ラットのみに発現した所見は、副腎、肝臓及び胃で認められた。副腎の所見として、うっ血（1 ヵ月間及び 3 ヵ月間投与の全用量）並びに軽微～顕著な壊死・鉱質沈着（6 mg/kg 以上の 1 ヵ月間及び 1 mg/kg 以上の 3 ヵ月間投与）が認められた。壊死・鉱質沈着は 2 ヵ月間又は 10 週間の回復期間後も持続した。副腎の変化の程度は幼若ラット（投与開始時約 8 週齢）の方がやや高かったが、成熟ラット（投与開始時約 17 週齢）でも認められたことから、この所見は副腎の成長又は発達に依存しないことが示唆された。ヒトにおいて副腎機能への影響は報告されていない。

ラットの肝臓所見として、1 ヵ月間投与試験では 6 mg/kg 以上で軽微～軽度の肝細胞凝固壊死の発現頻度が増加し、概して 20 mg/kg 以上で血清中アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）、アラニントランスアミナーゼ（ALT）及びアルカリホスファターゼ（ALP）の増加が認められた。肝細胞壊死は回復期間後も 60 mg/kg で雄のみに認められた。3 ヵ月間投与試験では、軽微～軽度の肝小葉中間帯の肝細胞空胞化が認められ、3 mg/kg 以上の雌では小壊死巣が散見されたが、血液生化学的検査値に関連する変化は認められなかった。この壊死所見は対照群と質的に類似しており、luspatercept との関連性は不明であった。空胞化は回復期間終了時にも認められた。

Approved v2.0

胃の所見として、胃腺部の粘膜固有層に軽微～軽度な鉱質沈着（1 ヵ月間投与試験の 6 mg/kg 以上）が認められた。胃における多巣性鉱質沈着は、2 ヵ月間の回復期間後も全用量の雄及び 20 mg/kg 以上の雌で持続した。一方、3 ヵ月間投与試験では最高用量 15 mg/kg まで胃に変化は認められなかった。

さらに、6 mg/kg 以上を 1 ヵ月間又は 3 mg/kg 以上を 3 ヵ月間投与したラットにおいて、心臓及び肺の重量減少が認められた。15 mg/kg を 3 ヵ月間投与した若齢雄ラットでは、前立腺重量の減少が認められた。これらの器官重量の減少に関連する病理組織学的変化はみられず、回復期間終了時までに回復又は回復傾向を示した。

ラット 3 ヵ月間投与試験における NOAEL は、検討した最低用量の 1 mg/kg で腎臓及び副腎に有害所見が認められたため決定できなかった。最小毒性量は 1 mg/kg Q2W と考えられ、本用量における曝露量（AUC(0-336h)）3917 µg•h/mL は臨床用量 1.75 mg/kg Q3W におけるヒト曝露量の約 0.6 倍に相当する。サルでは、腎臓の所見に基づく 6 ヵ月間投与試験の NOAEL は 0.3 mg/kg と考えられ、本用量における曝露量（AUC(0-336h)）1228 µg•h/mL は同ヒト曝露量の約 0.2 倍に相当する。

4.3 遺伝毒性試験

Luspatercept の遺伝毒性試験は実施していない。

4.4 がん原性試験

Luspatercept はバイオ医薬品であり、ICH ガイドライン ICH S6(R1)で標準的ながん原性試験は一般的に不適当と示されていることから、実施していない。さらに、げっ歯類における luspatercept の免疫原性により、3 ヵ月間を超える投与で毒性評価に適切な曝露量を維持することが困難である。これらのことから米国及び欧州においては、luspatercept のげっ歯類を用いたがん原性試験の実施は不要であることが合意されている。

なお、幼若ラットを用いた毒性試験で 3 例に血液悪性腫瘍（リンパ腫、骨髄性白血病、リンパ性白血病が各 1 例）が最高用量の 10 mg/kg のみで認められた。リンパ腫及び白血病は、ラット 2 年間投与がん原性試験で多くみられるが、26 週齢未満のラットでの発生はまれであり、luspatercept 投与との関連性は明らかでない。また、ラット 3 ヵ月間投与試験において高用量群（15 mg/kg）の雌 1 例が Week 11 に死亡発見され、播種性多形性リンパ腫と診断されたが、本例の腫瘍は自然発生性のもので luspatercept との関連性はないと判断された。10 mg/kg を Q2W 投与した幼若ラットの曝露量（AUC(0-336h)：20054 µg•h/mL）は、1.75 mg/kg を Q3W 投与した MDS 患者の曝露量の 3.1 倍に相当した。

幼若ラット試験で認められた腫瘍と luspatercept との因果関係は明確には確立されておらず、成人患者への関連性も不明である。サル 6 ヵ月間投与試験を含む一連の非臨床安全性試験において、いずれの動物種でも luspatercept に起因する腫瘍性、増殖性及び前腫瘍性病変は認められなかった。また、ルイス肺癌のマウスモデルにおいて RAP-536 は腫瘍増殖に影響を及ぼさなかった[21]。

Approved v2.0

4.5 生殖発生毒性試験

胚・胎児発生に関する試験を妊娠 SD ラット及び NZW ウサギを用いて実施した。ラットでは最高用量 30 mg/kg、ウサギでは最高用量 40 mg/kg を、それぞれ器官形成期に週 1 回、合計 2 回投与した。Luspatercept はラットでは選択的な発生毒性（母動物に影響なく胎児のみに影響）を示し、ウサギでは母動物毒性及び胎児の発生毒性を示した。いずれの動物種においても、生存胎児数及び胎児体重の減少並びに吸収胚数、着床後胚損失率及び骨格変異の増加が認められた。両動物種ともに NOAEL は 5 mg/kg と考えられ、本用量における曝露量（推定 AUC(0-336h)）はラットで 12332 µg•h/mL、ウサギで 24840 µg•h/mL であり、ヒト曝露量のそれぞれ 1.9 倍及び 3.8 倍に相当する。

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験（最高用量 15 mg/kg Q2W）では、黄体数及び着床数が有意に減少し、これらの影響の二次的変化として生存胚数の減少が認められ、ラット胚・胎児発生試験の所見と一致した。Luspatercept を投与した雄と無処置の雌との交配では、交配能、受胎能及び胎児所見に影響は認められなかった。雄親動物の一般毒性及び生殖毒性に関する NOAEL は 15 mg/kg、雌親動物の一般毒性及び生殖毒性に関する NOAEL は 3 mg/kg と考えられた。ラット 3 ヵ月間投与試験の曝露量から、これらの NOAEL における曝露量（AUC(0-336h)）は、雄親動物（15 mg/kg）で 30755 µg•h/mL、雌親動物（3 mg/kg）で 6682 µg•h/mL と推定された。これらの曝露量は、ヒト曝露量のそれぞれ 4.8 倍及び 1.0 倍に相当する。これらの影響の回復性を評価した追加試験では、15 mg/kg で雌にみられた受胎能への有害作用は 14 週間の回復期間後に完全に回復した。

ラット出生前及び出生後の発生に関する試験では、最高用量 30 mg/kg まで親動物の妊娠・哺育に luspatercept に関連した有害作用は認められなかった。F1 世代では、投与に関連した毒性所見として、出生時から哺育期間中及び離乳後（生後 28 日）まで体重の低値がみられ、雌雄ともに交配前期間まで持続し、雄では交配期間及び交配後期間まで持続した。F1 世代では全用量で腎臓の有害所見（軽微な膜性増殖性糸球体腎炎、軽微～軽度の尿細管萎縮・形成不全、軽微～軽度な血管拡張及びこれに関連した散発的な出血）が認められたが、行動指標、受胎能及び生殖指標への影響は認められなかった。したがって、F1 世代の行動指標、受胎能及び生殖能に関する NOAEL は 30 mg/kg と判断された。NOAEL における曝露量（AUC(0-336h)）は、ラット胚・胎児発生試験での妊娠 10 日の曝露量（AUC(0-168h)：34488 µg•h/mL）に基づき 68976 µg•h/mL と推定され、ヒト曝露量の 10.7 倍に相当する。

4.6 幼若動物の毒性試験

SD ラットを用いた用量設定試験及び最終的な幼若動物を用いた毒性試験を実施した。用量設定試験では、新生児ラットに luspatercept を 0、1、6 及び 15 mg/kg の用量で生後 7 日～56 日又は生後 21 日～70 日に投与した。最終試験では、luspatercept を 0、1、3 及び 10 mg/kg の用量で生後 7 日～91 日に投与し、回復性も評価した。

Approved v2.0

4.4 項に示した血液悪性腫瘍を除き、成熟ラットを用いた反復投与毒性試験で認められた所見（4.2 項）の多くは幼若ラットでもみられ、腎臓の糸球体腎炎、副腎の出血・うっ血、壊死及び鉱質沈着、胃の粘膜鉱質沈着、心臓重量の減少が観察された。幼若ラットのみにみられた所見は、腎髄質内層の尿細管萎縮・形成不全であった。変化は生後 7 日から投与開始した群のヘンレ係蹄の細い部分にみられ、生後 21 日から投与開始した群では腎尿細管萎縮がみられなかったが、ラットの腎臓において尿細管は生後 15 日まで急速な細胞増殖期にあるとの報告[22]と一致した。その他の luspatercept に関連した所見は、雄で亀頭包皮分離の遅延、雌雄で生殖能への影響（交尾率の低下）及び有害ではない骨密度の低下であった。生殖能への影響は 3 ヵ月間以上の回復期間後にもみられた。

幼若動物を用いた試験では、成熟ラットの反復投与毒性試験と同様に、すべての用量で腎臓及び副腎への影響が認められたことから NOAEL は決定されず、幼若ラットにおける最小毒性量（LOAEL）は 1 mg/kg Q2W と考えられた。本用量における曝露量（AUC(0-336h)）は 2636 µg•h/mL と推定され、ヒト曝露量の 0.4 倍に相当する。

4.7 原薬及び製剤

Luspatercept の製剤に新規添加剤は使用されていない。製剤中の不純物について、安全性評価を実施し、いずれも文献又は臨床的前例に基づいて許容濃度内に規格設定された【M2.3、S.3.2 項及び S.2.6 項】。また、毒性試験、臨床試験及び市販用の各ロットの同等性が示されている【M2.3、P.2.3 項】。

4.8 動物とヒトの曝露量比較

主要な毒性試験（ラット 3 ヵ月間及びサル 6 ヵ月間反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、幼若動物毒性試験）で得られた無毒性量・最小毒性量における定常状態の曝露量と、臨床用量におけるヒト曝露量との曝露量比を Table 4.8-1 に示す。ヒト曝露量は、最大臨床用量 1.75 mg/kg Q3W を投与した被験者の定常状態における AUC(0-504h) 推定値 6468 µg•h/mL 及び Cmax 推定値 16.5 µg/mL［1 mg/kg Q3W 投与時の定常状態における AUC(0-21d) の幾何平均値 154 day•µg/mL 及び Cmax の幾何平均値 9.45 µg/mL【M5.3.3.5.4 ACE-536-MPK-008 Table 5.1.5.2-1】から外挿］を用いた。

Table 4.8-1: Luspatercept の無毒性量又は最小毒性量における曝露量とヒト曝露量との比

動物種、試験の種類	LOAEL/ NOAEL [a] (mg/kg)	血清中濃度		曝露量比 [b]	
		Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg•h/ml)	Cmax	AUC
ラット 3 ヵ月間	1	12.64	3917	0.8	0.6
サル 6 ヵ月間	0.3	5.4	1228	0.3	0.2
ラット生殖能（雄）[c]	15	100.7	30755	6.1	4.8
ラット生殖能（雌）[c]	3	19.9	6682	1.2	1.0

Approved v2.0

Table 4.8-1: Luspatercept の無毒性量又は最小毒性量における曝露量とヒト曝露量との比

動物種、試験の種類	LOAEL/ NOAEL [a] (mg/kg)	血清中濃度		曝露量比 [b]	
		Cmax (μg/mL)	AUC(0-336h) (μg•h/ml)	Cmax	AUC
ラット胚・胎児発生	5	58.2	12332	3.5	1.9
ウサギ胚・胎児発生	5	91.1	24840	5.5	3.8
ラット出生前・出生後発生 [d]	30	326	68976	19.8	10.7
ラット幼若動物毒性	1	10.4	2636	0.6	0.4

LOAEL = 最小毒性量、NOAEL = 無毒性量

[a] ラット 3 ヵ月間試験及び幼若ラット試験は最小毒性量
[b] 最高臨床用量 1.75 mg/kg Q3W におけるヒトの定常状態時 Cmax 16.5 μg/mL 及び AUC(0-504h) 6468 μg•h/mL との比
[c] ラット 3 ヵ月間反復投与毒性試験の TK 値から外挿
[d] ラット胚・胎児発生に関する試験の TK 値（妊娠 10 日）から外挿

5 総括及び結論

薬理試験において、luspatercept は検討した動物種で赤血球パラメータを速やかかつ持続的に増加させることが示された。特に、後期段階にある赤血球前駆細胞が増加する傾向があったことや、luspatercept 投与後の短時間（12 時間）で赤血球パラメータが増加したことから、luspatercept は主に成熟期にある赤血球に影響を及ぼすと考えられる。

SPR 法によりリガンド結合能を、またレポーター遺伝子アッセイにより細胞内シグナル伝達活性化に対する阻害作用を検討した結果、luspatercept は特定の TGF-β スーパーファミリーリガンドを特異的に捕捉し、その作用を阻害することが示された。現時点では、luspatercept が捕捉する標的リガンドのうち、いずれのリガンドが本薬の作用機序に関して最も重要なものであるかを結論付けるのは難しいが、本資料で示した luspatercept の in vitro 作用のほとんどは GDF11 に対して得られている。また、マウス胎児肝臓由来の赤血球前駆細胞を GDF11 で処置すると Smad2/3 のリン酸化が亢進するが、luspatercept 存在下ではこの増加が半分未満に抑制されること等も報告されている [11]。GDF11 は赤血球コンパートメントに発現することも示されていることからも、GDF11 の重要性が示唆される。In vivo 薬理試験では luspatercept は後期赤血球前駆細胞の分化成熟を促進することが示唆された。すなわち、RAP-536 は投与後 72 時間には骨髄及び脾臓の Baso E を減少させることや、luspatercept による赤血球パラメータ増加作用の発現は速やか（投与後 12 時間）であったこと、luspatercept の急性の赤血球数増加作用は抗 EPO mAb 存在下でも発現することなどが確認され、これらは EPO は早期赤芽球のみを刺激する[23]のに対し、luspatercept は後期赤血球前駆細胞を標的にするという結論を支持するものであった。以上の作用が MDS モデルマウスの貧血状態に対する治療効果に繋がるものと考えられる。

Approved v2.0

カニクイザルを用いた 1 ヵ月間及び 3 ヵ月間反復皮下投与毒性試験において安全性薬理作用を検討したところ、検討したいずれの用量においても luspatercept 投与に関連した心血管系、呼吸器系及び神経系への影響は認められなかった。

Luspatercept はいずれの動物種においても初回投与後の血清中濃度は一次吸収及び一次消失の推移を示した。Luspatercept の PK プロファイルは線形性を示し、AUC 及び Cmax はいずれの動物種においても用量にほぼ比例し、雌雄で同程度であった。Tmax はラットで約 2～4 日、ウサギで約 3 日、サルで約 2～3 日であり、用量に依存しなかった。クリアランスは用量及び投与経路に依存しなかった。Luspatercept の絶対的バイオアベイラビリティは 76%～135%であった。反復投与試験における消失半減期は、幼若及び成熟ラットで約 3～9 日、ウサギで約 2～3 日、サルで約 5～8 日であった。妊娠ラット及びウサギに 2 回目の luspatercept を投与後の消失半減期はラットで約 1.5 日、ウサギで約 2 日であった。単回投与試験の消失半減期と呼応して、Q2W 投与で投与期間を通じて持続的な曝露が得られ、反復投与毒性試験で軽度の蓄積が認められた。

Luspatercept に特異的な ADA はラットを用いた一般毒性試験、幼若動物を用いた毒性試験及び胚・胎児発生に関する試験で検出されたが、ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験（63.8%）を除き、その発現頻度は低かった。ラットを用いた 3 ヵ月間反復投与毒性試験で、高力価の ADA の産生により luspatercept の血清中濃度が低下したが、他の試験では TK プロファイルに及ぼす影響は認められなかった。また、サルを用いた 1、3 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験で、ADA 陽性率は低かった。サルを用いた 1 及び 3 ヵ月間反復投与毒性試験で、低力価の ADA が産生されたが、TK プロファイルに影響を及ぼさなかった。ADA は少数のウサギでも検出され、母動物及び胎児における luspatercept の濃度低下と関連性が認められた。

胚・胎児発生に関する試験では、胚中から luspatercept が検出されたことから、luspatercept は胎盤膜を通過することが示唆された。SD ラットを用いた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において luspatercept の胎盤通過について定量的に評価した結果、平均胎盤通過率（すべての母動物血清中濃度に対する胎児血清中濃度の割合の平均値）は 13.4%であった。授乳中ラットを用いた乳汁移行に関する試験で、luspatercept の平均乳汁移行率は 12%であった。Luspatercept は、その異化が蛋白質分解経路を介して起こり、また、分子量に基づくと腎排泄されないと予測される蛋白質医薬品であることから、動物を用いた代謝及び排泄に関する検討を行わなかった。同様に、luspatercept は高分子量の蛋白質医薬品であるため、チトクローム P450 により代謝される化合物との相互作用を起こす可能性は低いと考えられることから、薬物相互作用に関する検討を行わなかった。

Luspatercept の毒性を評価する試験として、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（それぞれ最長 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間）、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、幼若動物を用いた毒性試験、ラットを用いた探索的な腎毒性試験を実施した。

Approved v2.0

評価に用いたすべての動物種で luspatercept の薬理作用に一致した、赤血球量（赤血球数、ヘマトクリット及びヘモグロビン）の増加が認められた。

ラット1ヵ月間及び3ヵ月間反復投与毒性試験で認められた主な所見は、心臓及び肺の重量減少（組織学的所見なし）、副腎の壊死・うっ血、肝臓の壊死、胃腺部の鉱質沈着、胸腺のうっ血、腎臓の膜性増殖性糸球体腎炎であった。回復期間終了時には、心臓及び肺重量の減少は回復傾向又は完全な回復性を示したが、副腎のうっ血及び壊死、胸腺のうっ血、肝臓の壊死並びに軽微な胃鉱質沈着は回復期間終了時にも認められた。なお、臨床試験の被験者では、これらの器官系に対する影響は報告されていない【M2.5、5.3.3 項】。

サル 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間投与試験で認められた主な毒性所見は、ラット試験でもみられた腎臓の膜性増殖性糸球体腎炎であり、さらに腎間質の線維化及び出血も認められた。6 ヵ月間投与試験のその他の腎臓所見として、尿細管蛋白の蓄積、混合性炎症性細胞浸潤及び尿細管の変性・萎縮が認められた。いずれのサル試験でも、免疫組織化学的検査で腎病変に免疫グロブリン及び補体が認められたが、これらの沈着物に luspatercept は検出されず、影響がみられた個体の大部分は ADA 陰性であった。したがって、腎臓の所見は luspatercept の直接作用によるものと推定されたが、免疫複合体沈着による変化の関与も除外できなかった。さらに、5/6 腎摘出モデルに luspatercept を 3 ヵ月間投与した腎毒性試験において、媒体を投与した腎摘出モデル及び luspatercept を投与した偽手術群と比較して、糸球体病変及び尿細管間質病変が顕著に亢進した。ラット及びサルの 3 ヵ月間投与試験では、最長 2 ヵ月間の回復期間終了時にも膜性増殖性糸球体腎炎が認められたが、サル 6 ヵ月間投与試験では最低用量の 1 mg/kg で 12 週間の回復期間後に回復性が認められた。膜性増殖性糸球体腎炎に関連して、ラットでは BUN、サルでは BUN、クレアチニン及び尿中アルブミン／クレアチニン比の変化が投与期間中に認められた。これらの luspatercept に関連した腎臓への影響に基づき、臨床試験では被験者の腎機能を綿密にモニタリングしており、ヒトにおいて腎障害と luspatercept 投与との関連性を示す所見は報告されていない【M2.5、5.3.3.2 項】。

サル 6 ヵ月間投与試験では、血管を含む脈絡叢の間質に混合性炎症細胞浸潤を主体とする変化が認められた。脈絡叢の免疫組織化学的検査により間質の補体（C3）顆粒の増加が認められ、泡沫状マクロファージによる補体成分の処理の増加を示唆するものと考えられた。この脈絡叢の所見は 12 週間の回復期間終了時までに回復した。ヒトにおけるこの潜在的リスクを評価するバイオマーカーは存在しない。第 3 相臨床試験（ACE536-MDS-001 及び ACE536-Bthal-001 試験）では、luspatercept 投与群で神経系障害の器官別大分類（SOC）に該当する試験治療下で発現した有害事象（TEAE）がみられた被験者の大部分で Grade 1 及び 2 の頭痛及び浮動性めまいが報告されたが、いずれも重篤な有害事象とは判断されなかった【M2.7.4、2.1.2 項】。サルにみられた脈絡叢の所見の臨床的意義は不明であるが、変化は軽微で有害ではないことから、臨床的有害事象として発現する可能性は低いと考えられる。

Approved v2.0

胚・胎児発生への影響について、ラット及びウサギを用いて検討した。Luspatercept はラットでは選択的な発生毒性（母動物に影響なく胎児のみに悪影響）を示し、ウサギでは母動物及び胎児に発生毒性（母動物及び胎児に悪影響）を示した。いずれの動物種においても、生存胎児数及び胎児体重の減少並びに吸収胚数、着床後胚損失及び骨格変異の増加が認められた。ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験では、黄体数、着床数及び生存胚数の有意な減少が認められた。Luspatercept を投与した雄を無処置の雌と交配させた結果、交配能、受胎能及び胎児に影響は認められなかった。追加試験の結果、雌の受胎能への影響は、14 週間の回復期間後に完全に回復した。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では、全用量で F1 出生児に体重減少及び腎臓の有害所見が認められたが、雌雄ともに行動指標、受胎能及び生殖指標への有害所見は認められなかった。Luspatercept は胎盤を通過する可能性があり、上記の所見から胎児発生に有害な影響を及ぼす可能性が考えられる。また、雌の受胎能への影響も考えられる。したがって、妊婦又は妊娠している可能性のある女性には本剤を投与しないことが望ましいことを添付文書で注意喚起する。

幼若ラット試験で認められた所見は、概して成熟ラットの所見と同様であった。さらに、生後 7 日から投与開始した出生児では、両側性の尿細管萎縮及び腎臓髄質内層の外側部形成不全が認められた。また、雄で亀頭包皮分離の遅延、雌雄で交尾率の低下が認められた。

幼若ラット毒性試験で血液悪性腫瘍が 3 例（リンパ腫、骨髄性白血病及びリンパ性白血病が各 1 例）に最高用量（10 mg/kg）のみで認められた。加齢ラットではリンパ腫及び白血病が多くみられるが、26 週齢未満のラットでこれらの腫瘍がみられることはまれであり、luspatercept 投与との関連性は否定できない。さらに、ラット 3 ヵ月間投与試験において、高用量（15 mg/kg）群の成熟雌が Week 11 に死亡発見され、播種性多形性リンパ腫と診断されたが、自然発生性のもので luspatercept との関連性はないと判断された。成熟ラット及びサルの試験では、本腫瘍以外に腫瘍の発生を示唆する所見は認められなかった。幼若ラットと成人被験者の曝露量比較では、10 mg/kg Q2W を投与したラットの曝露量は、臨床最高用量 1.75 mg/kg Q3W を投与したヒトの曝露量（推定 AUC(0-504h)：6468 µg•h/mL）の約 3.1 倍であった。これらの腫瘍所見がヒト（成人）で発現する可能性については明らかでない。これまでに蓄積された臨床経験からは、luspatercept を投与した被験者における悪性腫瘍のリスク増加を示唆する所見は報告されておらず【M2.5、5.3.3.1 項】、実施中の試験では長期追跡調査を継続している。血液悪性腫瘍のリスクは luspatercept の潜在的リスクと考えられ、添付文書に記載して注意喚起する。血液悪性腫瘍のモニタリングを、進行中の臨床試験の長期追跡調査及び市販製品の医薬品安全性監視の一環として実施する。

Luspatercept に結合する主要な TGF-β スーパーファミリーメンバー（GDF11、GDF8、アクチビン B 及び BMP6）は、多数の組織及び器官系の成長、発生、恒常性及び機能に対して多様な影響を及ぼす[24]。このリガンドファミリーが関与する生体内機能は複雑かつ高度に重複しているため、これらのリガンドの作用の攪乱により生じる可能性のある続発症をある程度の確実性で予測することは困難である。しかしながら、luspatercept の毒性試験ではこれらの阻害が有害な影響を及ぼす可能性が

Approved v2.0

広範囲に検討されている。毒性試験で認められた主な有害作用のうち、ラット及びサルにおける腎障害については、BMP6 と腎臓の発生及び恒常性との関連性が知られていることからリガンド機能との関連性が最も高いと考えられる。しかし、臨床試験では実施している腎臓の機能及び完全性の綿密なモニタリングから luspatercept の投与に関連した腎障害は報告されていない。特に、ラット生殖毒性試験で成熟雌の受胎能並びにラット幼若動物試験で雌雄の受胎能に雌雄の受胎能に影響が認められたことは、luspatercept とアクチビン B との相互作用を反映している可能性が考えられる。なお、成熟ラットではこれらの影響には回復性があることが追加試験により確認されている。神経学的所見及び中枢神経系関連所見については、サル 6 ヵ月間投与毒性試験で認められた脈絡叢の軽微で有害ではない変化を除いて認められなかったことから、luspatercept は中枢神経系の GDF11 の機能に影響を及ぼさないと考えられる。Luspatercept に関連した骨格変異の発現頻度増加は胎児発生に関する所見に限定され、成熟動物を用いた単回及び反復投与試験では骨格異常及び筋肉異常は認められなかったことからも、成人におけるアクチビン B、GDF8 及び GDF11 への luspatercept の影響は小さいことが示唆された。非臨床試験で認められた他の器官系（心臓、肝臓、胃、肺、副腎、胸腺）への luspatercept の影響は軽度で散発的若しくはげっ歯類特異的で、そのほとんどは回復性であった。血液学的変化は luspatercept の意図する作用と一致し、赤血球系パラメータ（赤血球、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の用量依存性の増加がすべての試験の全用量で認められた。以上より、luspatercept と相互作用する主要なリガンドである GDF11、GDF8、BMP6 及びアクチビン B の十分に解明されている機能に対して luspatercept が重大で不可逆的な有害作用を及ぼすことを示唆する所見は、成熟動物を用いた非臨床毒性試験及びヒトの臨床試験において認められていない。

以上、本概括評価に記載した一連の非臨床試験を実施し、luspatercept の有効性、薬物動態及び安全性を評価した。各種試験の成績から、luspatercept を MDS における貧血の治療薬として製造販売承認申請するための非臨床における有効性、薬物動態及び安全性が確認された。

Approved v2.0

6 参考文献

[1] Breda L, Rivella S. Modulators of erythropoiesis: Emerging therapies for hemoglobinopathies and disorders of red cell production. Hematol Oncol Clin North Am 2014;28:375-86.

[2] Ribeil JA, Arlet JB, Dussiot M, et al. Ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. ScientificWorldJournal 2013;2013:394295.

[3] Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2013;2:47-63.

[4] Christian JL, Heldin CH. The TGFβ superfamily in Lisbon: navigating through development and disease. Development 2017;144:4476-80.

[5] Maguer-Satta V, Bartholin L, Jeanpierre S, et al. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. Exp Cell Res 2003;282:110-20.

[6] Shiozaki M, Kosaka M, Eto Y. Activin A: a commitment factor in erythroid differentiation. Biochem Biophys Res Commun 1998;242:631-5.

[7] Söderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-β superfamily signaling. Ann N Y Acad Sci 2009;1176:55-69.

[8] Wu HH, Ivkovic S, Murray RC, et al. Autoregulation of neurogenesis by GDF11. Neuron 2003;37:197-207.

[9] Kim J, Wu HH, Lander AD, et al. GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. Science 2005;308:1927-30.

[10] Walker RG, Czepnik M, Goebel EJ, et al. Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. BMC Biol 2017;15:19.

[11] Suragani RN, Cadena SM, Cawley SM, et al. Transforming growth factor-β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. Nat Med 2014;20:408-14.

[12] Dussiot M, Maciel TT, Fricot A, et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β-thalassemia. Nat Med 2014:20:398-407.

[13] Suragani RN, Cawley SM, Li R, et al. Modified activin receptor IIB ligand trap mitigates ineffective erythropoiesis and disease complications in murine β-thalassemia. Blood 2014;123:3864-72.

[14] Zhou L, Nguyen AN, Sohal D, et al. Inhibition of the TGF-beta receptor I kinase promotes hematopoiesis in MDS. Blood 2008;112:3434-43.

[15] Wijayarathna R, de Kretser DM. Activins in reproductive biology and beyond. Hum Reprod Update 2016;22:342-57.

Approved v2.0

[16] Bloise E, Ciarmela P, Dela Cruz C, et al. Activin A in mammalian physiology. Physiol Rev 2019;99:739-80.

[17] Lin YW, Slape C, Zhang Z, et al. NUP98-HOXD13 transgenic mice develop a highly penetrant, severe myelodysplastic syndrome that progresses to acute leukemia. Blood 2005;106:287-95.

[18] Martinez-Hackert E, Sundan A, Holien T. Receptor binding competition: A paradigm for regulating TGF-β family action. Cytokine Growth Factor Rev 2021;57:39-54.

[19] Butt M, Whitney K, Davis W, Arkella S, Parker S, Foley G. Microscopic background changes in brains of cynomolgus monkeys. Toxicol Pathol 2015;43:513-18.

[20] 20039148 Final Celegene Memo to the Study File (Memo to the Study File TPSDOC00305). Tox Path Specialists, LLC; 2018.

[21] The effects of RAP-536 on Lewis lung carcinoma growth (Pharmacology Study Report PPR113). Acceleron Pharma, Inc.; 2016.

[22] Marquez MG,. Cabrera I, Serrano DJ, et al. Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. Anat Embryol 2002;205:431-40.

[23] Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, et al. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. Blood 2011;118:6258-68.

[24] Potential non-targeted actions of luspatercept (Memo ACE-536-CLG-PS). Celgene Corporation; 2019.