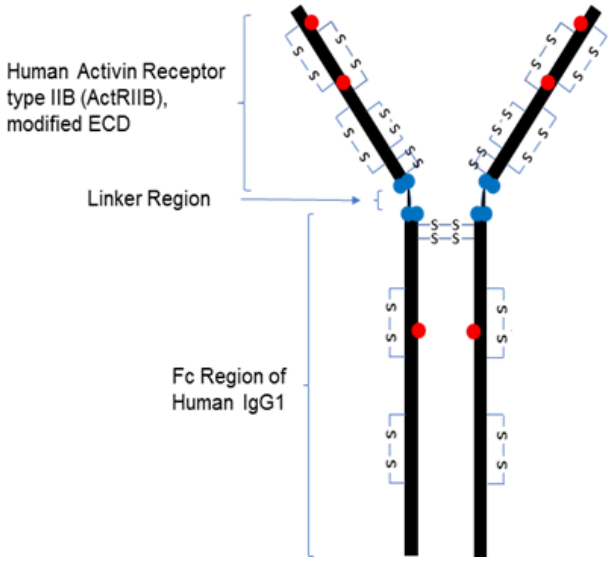
# 1 緒言

Luspatercept は、骨髄異形成症候群に伴う貧血の治療薬として開発中の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、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タンパク質群である。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が知られている。

Luspatercept はヒト ActRIIB の細胞外ドメイン（ECD）にヒト免疫グロブリン G1（IgG1）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］をリンカーを介して結合させた組換え融合タンパク質であり（Figure 1-1）、ECD を改変することでリガンド結合性を改善している。Luspatercept は、赤血球産生の後期段階に負の調節因子として関与することが知られている増殖分化因子（GDF）11 等の特定の TGF-β スーパーファミリーリガンドを捕捉し、これらのリガンドによる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。その結果、分化成熟過程の後期段階にある赤血球前駆細胞群の分化能が正常化され、成熟赤血球数が増加する。これらの新規作用機序に基づき、luspatercept は骨髄異形成症候群に伴う貧血に対する治療薬となることが期待される。

**Figure 1-1: Luspatercept の構造**






Approved v1.0

効能又は効果（案）：骨髄異形成症候群（環状鉄芽球と血小板増加を伴う骨髄異形成／骨髄増殖性腫瘍を含む）に伴う貧血

用法及び用量（案）：通常、成人にはルスパテルセプト（遺伝子組換え）として 1 回 1.0 mg/kg を 3 週間間隔で皮下投与する。なお、貧血の程度等により適宜増減する。ただし、最大投与量は 1 回 1.75 mg/kg とする。



Approved v1.0

**Table of Contents**

1 まとめ ..... 6
2 効力を裏付ける試験 ..... 7
2.1 In vitro 薬理試験 ..... 7
2.1.1 表面プラズモン共鳴によるリガンド結合能試験 ..... 7
2.1.2 細胞内シグナル伝達活性化の阻害 ..... 12
2.2 In vivo 薬理試験 ..... 13
2.2.1 作用機序に関する検討 ..... 14
2.2.1.1 正常動物における血液学的パラメータに対する薬力学的作用 ..... 14
2.2.1.2 赤血球半減期に対する影響 ..... 17
2.2.1.3 血漿量に対する作用 ..... 19
2.2.1.4 骨髄及び脾臓における赤血球前駆細胞集団に対する影響 ..... 19
2.2.1.5 内因性エリスロポエチン産生に対する影響 ..... 23
2.2.1.6 Luspatercept が有する赤血球パラメータに対する作用のエリスロポエチン非依存性 ..... 27
2.2.2 骨髄異形成症候群モデルマウスを用いた薬効評価 ..... 33
3 副次的薬理試験 ..... 39
4 安全性薬理試験 ..... 39
5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 40
6 考察及び結論 ..... 40
7 参考文献 ..... 42



Approved v3.0

**List of Tables**

Table 2.1.1-1: トランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリーリガンドに対するluspatercept のリガンド選択性とその結合親和性 ..... 9

Table 2.1.1-2: トランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリーリガンドに対するluspatercept 及び RAP-536 の結合親和性 ..... 10

Table 2.1.2-1: 各種細胞株を用いた pGL3 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを用いた luspatercept によるリガンド依存性シグナル伝達活性化の阻害 ..... 13

Table 2.2.1.4-1: 大腿骨及び脾臓の赤血球前駆細胞に対する RAP-536 の影響 ..... 21

Table 2.2.1.6-1: Luspatercept の赤血球パラメータに対する作用がエリスロポエチンに依存するか否かを検討する試験の投与デザイン（試験日別の投与薬物と試験終了日） ..... 28

**List of Figures**

Figure 2.2.1-1: 赤血球の分化成熟過程と luspatercept の作用の関係 14
Figure 2.2.1.1-1: マウスに luspatercept を皮下投与（週 2 回、8 週間）したときの赤血球パラメータの用量依存的な増加 15
Figure 2.2.1.1-2: マウスに luspatercept を腹腔内投与した時の赤血球パラメータ増加の短期的経時変化 16
Figure 2.2.1.2-1: 赤血球半減期に対する RAP-536 及びエリスロポエチンの影響 18
Figure 2.2.1.3-1: 血漿量に及ぼす RAP-536 の影響 19
Figure 2.2.1.4-1: マウス赤血球前駆細胞集団に対する RAP-536 の影響 20
Figure 2.2.1.5-1: Luspatercept 投与による腎臓及び血清におけるエリスロポエチンレベルの変化 24
Figure 2.2.1.5-2: Luspatercept のマウス赤血球数増加作用の持続性 25
Figure 2.2.1.5-3: Luspatercept によるマウス血清エリスロポエチンレベル変化の持続性 25
Figure 2.2.1.5-4: 血清エリスロポエチン濃度に対する luspatercept 長期投与の影響 26
Figure 2.2.1.5-5: マウス赤血球パラメータに対する luspatercept とエリスロポエチンの増加作用における併用投与の影響 27
Figure 2.2.1.6-1: Luspatercept 又は抗エリスロポエチンモノクローナル抗体を単独又は併用投与したマウスにおける赤血球パラメータ並びに血清及び腎臓エリスロポエチンレベルの変化 30
Figure 2.2.1.6-2: RAP-536 又は抗エリスロポエチンモノクローナル抗体を単独又は併用投与したマウスにおける赤血球パラメータの変化 32
Figure 2.2.2-1: 骨髄異形成症候群モデルマウスにおける赤血球数に対する RAP-536 の作用 34
Figure 2.2.2-2: 骨髄異形成症候群モデルマウスの生存能に対する RAP-536 の影響 35
Figure 2.2.2-3: 骨髄異形成症候群（初期、中期及び後期）のモデルマウスにおける赤血球パラメータに対する RAP-536 の作用 36
Figure 2.2.2-4: 骨髄異形成症候群（初期及び後期）モデルマウスの骨髄における赤血球過形成に対する RAP-536 の影響 37
Figure 2.2.2-5: 骨髄異形成症候群（初期、中期及び後期）のモデルマウスにおける骨髄赤血球前駆体に対する RAP-536 投与の影響 38
Figure 2.2.2-6: 後期骨髄異形成症候群モデルマウスの脾臓における Smad2/3 活性化に対する RAP-536 の作用 39



Approved v3.0

用語及び略号一覧

| 略号 | 英語 | 日本語 |
|---|---|---|
| ACE-536, ACE-036, BMS-986346 | luspatercept の開発コード番号 | |
| ActRIIA | activin receptor type IIA | アクチビン受容体 IIA 型 |
| ActRIIB | activin receptor type IIB | アクチビン受容体 IIB 型 |
| ALK | activin receptor-like kinases | アクチビン受容体様キナーゼ |
| AMHRII | anti-müllerian hormone receptor type II | 抗ミュラー管ホルモン受容体 II 型 |
| 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, BasoE | 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） |
| BM | bone marrow | 骨髄 |
| BMP | bone morphogenetic protein | 骨形成タンパク質 |
| BMPRII | bone morphogenetic protein receptor type II | 骨形成タンパク質受容体 II 型 |
| BRE | BMP-responsive element | BMP 応答エレメント |
| CAGA12 | cancer-associated galactosyltransferase acceptor 12 | 癌関連ガラクトシルトランスフェラーゼアクセプター12 |
| CFC | colony forming cells | コロニー形成細胞 |
| 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） |
| CFU-GEMM | colony forming unit-granulocyte/macrophage | 顆粒球・赤芽球・単球・巨核球コロニー形成細胞 |
| CFU-GM | granulocyte-macrophage colony forming units | 顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞 |
| CH | constant heavy chain | 重鎖定常領域 |
| ECD | extracellular domain | 細胞外ドメイン |
| EPO | erythropoietin | エリスロポエチン |
| Fc | fragment crystallizable | 結晶化フラグメント |
| GDF | growth and differentiation factor | 増殖分化因子 |
| GDNF | glial-derived neurotrophic factor | グリア細胞株由来神経栄養因子 |
| 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 |
| HCT | hematocrit | ヘマトクリット値 |



Approved v3.0

| 略号 | 英語 | 日本語 |
|---|---|---|
| HGB | hemoglobin | ヘモグロビン濃度 |
| hu | human | ヒト |
| IC50 値 | 50% inhibitory concentration | 50%阻害濃度 |
| Ig | immunoglobulin | 免疫グロブリン |
| $K_D$ 値 | dissociation constant | 解離定数 |
| m | murine | マウス |
| mAb | monoclonal antibody | モノクローナル抗体 |
| MDS | myelodysplastic syndromes | 骨髄異形成症候群 |
| MIS | müllerian inhibiting substance | ミュラー管抑制物質 |
| mRNA | messenger ribonucleic acid | メッセンジャーリボ核酸 |
| NHD13 | NUP98-HOXD13 | ― |
| NT | not tested | 検討せず |
| Ortho E, OrthoE | orthochromatic erythroblast | 正染性赤芽球 |
| Poly E, PolyE | polychromatic erythroblast | 多染性赤芽球 |
| Pro E | proerythroblast | 前赤芽球 |
| RAP-536 | luspatercept のマウス相同タンパク質の開発コード番号 | |
| RBC | red blood cell | 赤血球（数） |
| Retic | reticulocyte | 網状赤血球 |
| SPR | surface plasmon resonance | 表面プラズモン共鳴 |
| TBS | Tris-buffered saline | トリス緩衝生理食塩液 |
| TGF-β | transforming growth factor beta | トランスフォーミング増殖因子 β |
| TGFβRII | transforming growth factor beta receptor II | トランスフォーミング増殖因子 β 受容体 II 型 |



Approved v3.0

# 1 まとめ

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タンパク質群である[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は、膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼである I 型受容体［アクチビン受容体様キナーゼ（ALK）1～7］及び II 型受容体［アクチビン受容体 IIA 型（ActRIIA）、ActRIIB、骨形成タンパク質受容体 II 型（BMPRII）、トランスフォーミング増殖因子 β 受容体 II 型（TGFβRII）、抗ミュラー管ホルモン受容体 II 型（AMHRII）］と相互作用し、細胞内シグナル伝達を活性化することが知られている[8]。TGF-β スーパーファミリーに属する TGF-β、アクチビン及び増殖分化因子（GDF）のいくつかは II 型受容体に高い親和性を以て結合し、さらに低親和性の I 型受容体を動員することで、細胞内 Smad シグナル経路関連分子をリン酸化する 6 量体シグナル伝達複合体（hexameric signaling complex）を形成する[9,10]。一方、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、GDF11 が嗅覚上皮[11]や網膜[12]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[13]。また、GDF11 の血中濃度上昇が MDS 患者[14]や MDS と同じく無効造血を特徴とする β サラセミア患者[15]で認められている。さらに、MDS[14] 及び β サラセミア[16]のモデルマウスや MDS 患者の骨髄細胞[17]で Smad2/3 リン酸化レベルの上昇が認められている。以上のことから、MDS の治療標的として TGF-β スーパーファミリーが注目されている。

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タンパク質であり、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、またタンパク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[18,19]に影響を及ぼさないことが期待できる。



Approved v3.0

Luspatercept及びそのマウス相同タンパク質であるRAP-536［構成ドメインであるECDはluspatercept のそれと同一であるが、ヒト IgG1 Fc ドメインをマウス IgG2a Fc ドメインに置き換えている］を用いた複数の in vitro 及び in vivo 薬理試験が実施されている。In vitro 試験により、luspatercept 及び RAP-536 は GDF11 及びその他の TGF-β スーパーファミリーリガンド（例えば、GDF8 やアクチビン B）に結合し、アクチビン受容体を介した下流シグナル伝達活性化（Smad2/3 リン酸化レベル上昇）を抑制することが示された。正常なマウス及びサルを用いた in vivo 試験では、luspatercept 及び RAP-536 は赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）を上昇させ、網状赤血球数も増加させた。なお、すべての血液学的パラメータは本薬投与中止により対照群又はベースライン値と同レベルになった。これらの作用や影響が MDS 動物モデルである NUP98-HOXD13 トランスジェニックマウス（以下、NHD13 マウス）の貧血状態に対する RAP-536 の治療効果に繋がるものと考えられる。

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。

以上のように、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ことから、既存薬が無効な MDS に伴う貧血に対しても luspatercept は有効性を示すことが期待される。

## 2 効力を裏付ける試験

### 2.1 In vitro 薬理試験

#### 2.1.1 表面プラズモン共鳴によるリガンド結合能試験

［試験番号 PPR089（M4.2.1.1-1）及び PPR125（M4.2.1.1-2）］

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 [9]。最初に実施した試験では、市販品の TGF-β スーパーファミリーに属するヒト又はマウスのリガンド 26 種に対する luspatercept の結合能を検討した。なお、げっ歯類、ウサギ及びカニクイザルとヒトの間で ActRIIB 受容体タンパク質のアミノ酸配列は保存されており、99%超が同一であった（M4.2.1.1-

[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 v3.0

2）。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に同程度の親和性を以て結合すると予測される。

全 26 種の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 との結合強度及び結合親和性を表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いて評価した（M4.2.1.1-1）。本試験では、luspatercept を抗ヒト Fc 抗体センサーチップ上に結合させ、その結合した luspatercept に各リガンドを相互作用させた。

本スクリーニングでは、最初のアッセイ［室温（20℃）で評価］で luspatercept と結合することが確認されたリガンドについて、さらに速度論的検討（37℃で評価）により結合親和性［解離定数（$K_D$ 値）］を決定した（Table 2.1.1-1）。その結果、luspatercept は骨形成タンパク質（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。



Approved v3.0

**Table 2.1.1-1: トランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリーリガンドに対する luspatercept のリガンド選択性とその結合親和性**

| リガンド | 20℃で実施したスクリーニングアッセイにおける結合強度 [a] | 37℃で実施した速度論的検討における結合親和性［$K_D$値（nM）］ |
|---|---|---|
| huBMP6 | ++++ | 0.18 |
| ヒトアクチビン B | ++ | 0.27 |
| huGDF11 | ++++ | 0.71 |
| huGDF8 | ++++ | 3.00 |
| huBMP10 | ++++ | 1.28 [b] |
| ヒトアクチビン A | + | 12.7 [b] |
| huBMP9 | +++ | 17.8 [b] |
| huBMP7 | + | 138 [b] |
| huGDF3 | + | 結合せず |
| huBMP2 | 200 nM で結合せず | 結合せず |
| ヒトアクチビン AC | + | NT |
| huBMP4 | 200 nM で結合せず | NT |
| huBMP3b/GDF10 | 結合せず | NT |
| huBMP5 | 結合せず | NT |
| mGDF5 | + | NT |
| mGDF6 | + | NT |
| mGDF7 | + | NT |
| huGDF15 | 結合せず | NT |
| huTGF-β1 | 結合せず | NT |
| huTGF-β2 | 結合せず | NT |
| huTGF-β3 | 結合せず | NT |
| ヒトペルセフィン | 結合せず | NT |
| アルテミン | 結合せず | NT |
| ニュールツリン | 結合せず | NT |
| huMIS | 結合せず | NT |
| huGDNF | 結合せず | NT |

GDNF：グリア細胞株由来神経栄養因子、hu：ヒト、m：マウス、MIS：ミュラー管抑制物質、NT：検討せず
いずれも n = 1 の結果を示す。
a 別途記載されているものを除き 100 nM で検討した。また、結合強度を+の数で示した（+の数が多いほど強力）。
b 複合体は非常に速やかに解離したため、正確な測定ができなかった。
出典：M4.2.1.1-1 より改変



Approved v3.0

次に実施した試験では、さらに多様なリガンドを擁する別の評価パネルを用いて先の速度論的検討と同様の方法（25℃で評価）により luspatercept の各リガンドとの結合親和性を検討した（M4.2.1.1-2）。この評価パネルは特定のヘテロ二量体も含む TGF-β スーパーファミリーに属する分子がほぼ完全に網羅されている。なお、結合プロファイルの類似性を確認するため、RAP-536 も併せて評価した。その結果、luspatercept は BMP6、アクチビン B、GDF11 及び GDF8 と高い親和性を以て結合するという先のアッセイ結果と一致した（Table 2.1.1-2）。また、luspatercept と RAP-536 のリガンド選択性はほぼ同じであった。

**Table 2.1.1-2: トランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリーリガンドに対する luspatercept 及び RAP-536 の結合親和性**

| リガンド | 結合親和性（25℃で評価） | |
|---|---|---|
| | **luspatercept** | **RAP-536** |
| huBMP6 | 4.398E-10 [a] | 4.551E-10 |
| ヒトアクチビン B | 1.634E-10 | 1.024E-10 |
| huGDF11（BMP11） | 4.792E-11 | 3.032E-11 |
| huGDF8 | 3.555E-10 | 1.335E-10 |
| huBMP10 | 3.369E-10 | 1.319E-10 |
| ヒトアクチビン A | 6.200E-9 | 2.243E-9 |
| huBMP9（GDF2） | 1.727E-9 | 6.614E-10 |
| huBMP7 | 1.526E-9 [a] | 1.001E-9 [a] |
| huGDF3 | 9.222E-9 | 7.437E-9 |
| huBMP2 | 結合せず | 結合せず |
| ヒトアクチビン AB | 8.262E-9 | 8.212E-9 |
| ヒトアクチビン AC | 2.997E-8 | 3.573E-8 |
| ヒトアクチビン C | 結合せず | 結合せず |
| huBMP4 | 結合せず | 結合せず |
| huBMP3b/GDF10 | 結合せず | 結合せず |
| huBMP5 | 2.363E-9 [a] | 1.877E-9 [a] |
| huBMP8b | 2.945E-8 | 2.462E-8 |
| huBMP4/7 | 2.989E-8 [a] | 4.770E-8 [a] |
| huBMP2/6 | 8.853E-10 [a] | 3.552E-10 [a] |
| huBMP（BMP8a） | 結合せず | 結合せず |
| huBMP15/GDF9b | 結合せず | 結合せず |
| huBMP3（BMP3a） | 結合せず | 結合せず |



Approved v3.0

**Table 2.1.1-2: トランスフォーミング増殖因子βスーパーファミリーリガンドに対する luspatercept 及び RAP-536 の結合親和性**

| リガンド | 結合親和性（25℃で評価） | |
|---|---|---|
| | **luspatercept** | **RAP-536** |
| huGDF1 | 1.922E-8 | 1.760E-8 |
| huGDF5 | ほぼ結合せず | ほぼ結合せず |
| mGDF5 | 9.309E-9 | 8.339E-9 |
| huGDF6 | ほぼ結合せず | ほぼ結合せず |
| mGDF6 | ほぼ結合せず [a] | ほぼ結合せず [a] |
| huGDF7 | 結合せず | 結合せず |
| mGDF7 | ほぼ結合せず [a] | ほぼ結合せず [a] |
| huGDF9 | 結合せず | 結合せず |
| huGDF15 | 結合せず | 結合せず |
| ヒトインヒビン A | 4.295E-8 | ほぼ結合せず |
| huTGF-β1 | 結合せず | 結合せず |
| huTGF-β2 | 結合せず | 結合せず |
| huTGF-β3 | 結合せず | 結合せず |
| ヒトペルセフィン | 結合せず | 結合せず |
| ヒトアルテミン | 結合せず | 結合せず [a] |
| ヒトニュールツリン | 結合せず | 結合せず |
| huMIS | 結合せず | 結合せず |
| huGDNF | 結合せず | 結合せず |
| huNodal:結節性 | 結合せず | 結合せず [a] |
| huLefty-2 (Lefty-A) | 結合せず | 結合せず |
| mLefty-1 | 結合せず | 結合せず |

a 非特異的結合が対照フローセルで観察されており、これが各フローセルで計測されたシグナルに影響を及ぼした可能性がある。
各リガンドは 10 nM 及び 100 nM で評価した。
結合親和性は $K_D$ 値（M）を E 表記で示した。
出典：M4.2.1.1-2 より改変



Approved v3.0

### 2.1.2 細胞内シグナル伝達活性化の阻害

［試験番号 PPR122（M4.2.1.1-3）］

前述のとおり、TGF-β スーパーファミリーリガンドは、I 型及び II 型受容体に結合し、細胞内シグナル伝達を活性化することが知られている。Luspatercept はこれらのリガンドの一部を捕捉することから、本試験において luspatercept の各種リガンドによって惹起される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。

前項の SPR 法にて結合を確認したリガンド（Table 2.1.1-1 及び Table 2.1.1-2）を含む一連の TGF-β スーパーファミリーリガンドによるアクチビン受容体活性化に対する luspatercept の阻害能を、レポーター遺伝子アッセイを用いて検討した。すなわち、評価するリガンドに応じて、各プロモーターモチーフの制御下にある pGL3 ルシフェラーゼレポーター遺伝子を別々の細胞にそれぞれ導入した。なお、対照となるウミシイタケレポータープラスミドは、トランスフェクション効率を標準化する目的で使用した。これらの細胞を種々のリガンドで刺激するとルシフェラーゼ活性が増強することが確認され、これらのリガンドの結合を阻害する分子は、アクチビン受容体を介した細胞内シグナル伝達活性化も減弱し、ルシフェラーゼ活性を低減させることが予想される。

TGF-β スーパーファミリーリガンドであるアクチビン A、アクチビン B、GDF8 及び GDF11 の結合により惹起される Smad2/3 を介した細胞内シグナル伝達活性化を、TGF-β 応答遺伝子であるプラスミノーゲン活性化抑制因子 1 や他の既知の TGF-β 応答遺伝子に存在する CAGA12 プロモーターモチーフの制御下で、pGL3 ルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクトしたヒト横紋筋肉腫細胞株（A204 細胞）を用いて検討した。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［50%阻害濃度（IC50 値）＝7.1 ng/mL］、若干、程度は低くなるものの GDF8（同 88 ng/mL）による Smad2/3 シグナル伝達活性化も阻害した（Table 2.1.2-1）。なお、GDF11 は赤血球産生の後期段階に負の調節因子として関与することが知られている。一方、アクチビン B によるシグナル伝達活性化に対する luspatercept の阻害作用の程度は非常に弱く、アクチビン A 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。

神経膠芽細胞腫細胞株（T98G 細胞）を用いた BMP9 又は BMP10 依存性シグナル伝達活性化に対する阻害作用の評価及びヒト肝細胞癌細胞株（HepG2 細胞）を用いた BMP6 依存性シグナル伝達活性化に対する阻害作用の評価には、BMP 応答エレメント（BRE）を含む pGL3 ルシフェラーゼレポータープラスミドを使用した。BRE モチーフは BMP 応答遺伝子 Id1 のプロモーターに存在すること[20]から、Smad1、5 及び 8 を介するシグナル経路の評価が可能になる。検討した濃度範囲において、luspatercept はこれらのリガンドによる Smad1/5/8 シグナル伝達活性化を阻害しなかった（Table 2.1.2-1）。



Approved v3.0

**Table 2.1.2-1: 各種細胞株を用いた pGL3 ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを用いた luspatercept によるリガンド依存性シグナル伝達活性化の阻害**

| シグナル伝達因子 | プロモーターエレメント | 細胞株 | リガンド | シグナル伝達活性化の阻害能［IC50 値（ng/mL）］ |
|---|---|---|---|---|
| Smad2/3 | CAGA12 | A204 細胞 | GDF11 | 7.1 |
| | | | GDF8 | 88 |
| | | | アクチビン B | 14400 |
| | | | アクチビン A | ~ 33300 |
| Smad1/5/8 | BRE | T98G 細胞 | BMP9 | > 3333 |
| | | | BMP10 | > 10000 [a] |
| | | HepG2 細胞 | BMP6 | > 10000 [a] |

n = 1-4 の結果を示す。
a 最高被験濃度
出典：M4.2.1.1-3 より改変

同様の細胞内シグナル伝達活性化阻害作用が同じレポーター細胞株を用いた別の試験でも認められている [14]。

以上の SPR 法やレポーター遺伝子アッセイのデータに基づき、luspatercept は主に GDF11 及び GDF8 に結合し、これらのリガンドによる細胞内シグナル伝達活性化を阻害することが明らかとなった。一方、本薬はアクチビン B や BMP6 といった GDF11 及び GDF8 以外のリガンドにも結合することが SPR 法により確認されたが、レポーター遺伝子アッセイではこれらのリガンドによるシグナル伝達活性化を阻害しなかった。この結合作用と阻害作用の不一致についてその詳細な理由は明らかではないが、アクチビン B や BMP6 等のリガンドは ActRIIB 以外の受容体とも相互作用することができ、様々な受容体が発現している生細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでは、ActRIIB ECD を構成ドメインとする luspatercept がそれらの相互作用を阻止することができなかった可能性が示唆される。

## 2.2 In vivo 薬理試験

In vivo 試験は主にげっ歯類を用いて実施し、赤血球パラメータ、赤血球前駆細胞集団及び EPO レベルに対する luspatercept の影響を検討した。Luspatercept 又はマウスにおける相同タンパク質である RAP-536 を用いた試験を実施した結果、両分子とも赤血球前駆細胞の分化成熟並びに赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の増加に対して同様の作用を示した。なお、luspatercept と RAP-536 のリガンド結合領域は同一であるものの、RAP-536 はマウス IgG2a Fc ドメインを構成成分とするのに対し、luspatercept のそれはヒト IgG1 Fc ドメインとなっている。RAP-536 のようなマウス相同タンパク質は、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



Approved v3.0

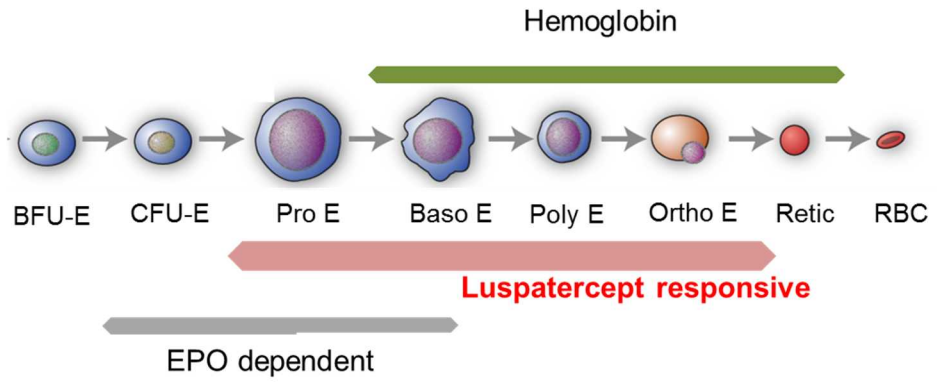
一般的に低い。そのため、免疫原性による影響を抑えることが可能となり、長期間に及ぶ薬理試験を比較的容易に実施できる。

### 2.2.1 作用機序に関する検討

赤血球産生には、成熟赤血球の形成に至るまでの増殖及び分化といった多くの過程が含まれる（Figure 2.2.1-1）。これらの過程には複数の赤血球産生サイトカインが関与しているが、その中でも EPO の役割が特に詳細に検討されている。一方、TGF-β スーパーファミリーの赤血球産生における機能やシグナル伝達の詳細については、その複雑さが故にいまだ研究途上にある [4,7]。

2.1 項に示したデータから、luspatercept 及び RAP-536 は、赤血球産生の後期段階に負の調節因子として関与する GDF11 と結合することが示された。また、以下で示した正常動物及びモデル動物を用いた薬理試験において、luspatercept/RAP-536 の投与により赤血球パラメータが改善すること、さらに、luspatercept は後期赤血球前駆細胞の分化成熟を促進させることが明らかとなった（Figure 2.2.1-1）。

**Figure 2.2.1-1: 赤血球の分化成熟過程と luspatercept の作用の関係**




Baso E：好塩基性赤芽球、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）、GDF：増殖分化因子、Ortho E：正染性赤芽球、Poly E：多染性赤芽球、Pro E：前赤芽球、RBC：赤血球、Retic：網状赤血球
出典：参考文献 14

#### 2.2.1.1 正常動物における血液学的パラメータに対する薬力学的作用

［試験番号 PPR062（M4.2.1.1-4）及び PPR065（M4.2.1.1-5）］

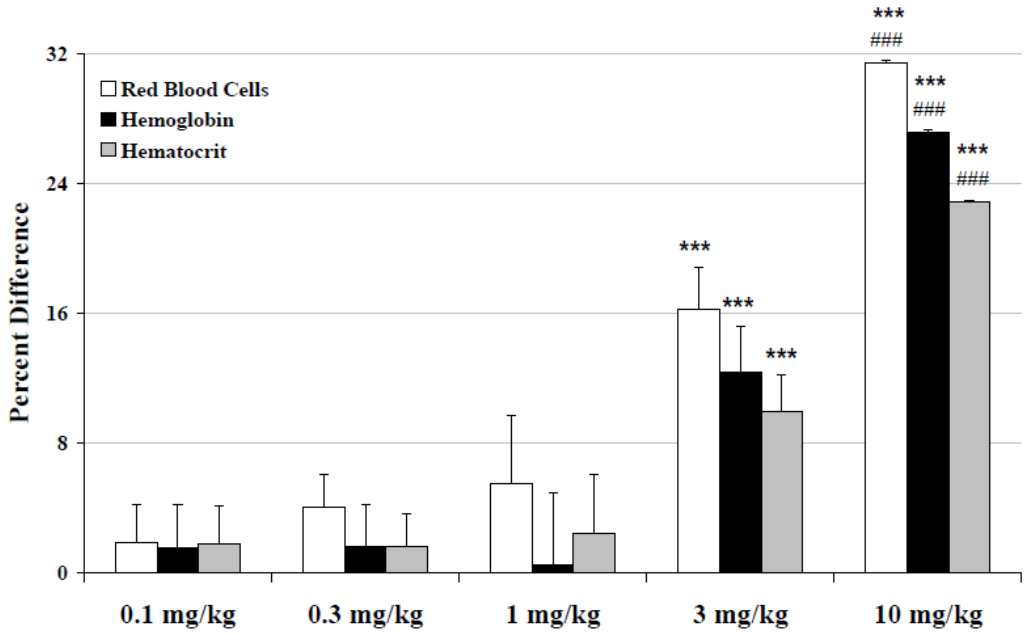
マウス及びサルに luspatercept 又は RAP-536 を投与すると赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が用量依存的に速やかに増加した。



Approved v3.0

マウスに luspatercept を 0.1～10 mg/kg の用量で週 2 回、8 週間皮下投与したところ、赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の統計学的有意（3 及び 10 mg/kg の用量において）かつ用量依存的な増加がみられたが（Figure 2.2.1.1-1）、脾臓及び肝臓の重量、体重並びに骨の成長（骨体積分率、骨梁数、厚さ及び骨間隔により評価）には影響はみられなかった（M4.2.1.1-4）。同様に 0.3～10 mg/kg の用量で RAP-536 を週 2 回、2 週間皮下投与したマウスにおいても赤血球数の用量依存的な増加が認められた[21]。これ以降の試験では、より明確な効果を得られる 10 mg/kg の用量で検討を行った。

**Figure 2.2.1.1-1:** **マウスに luspatercept を皮下投与（週 2 回、8 週間）したときの赤血球パラメータの用量依存的な増加**



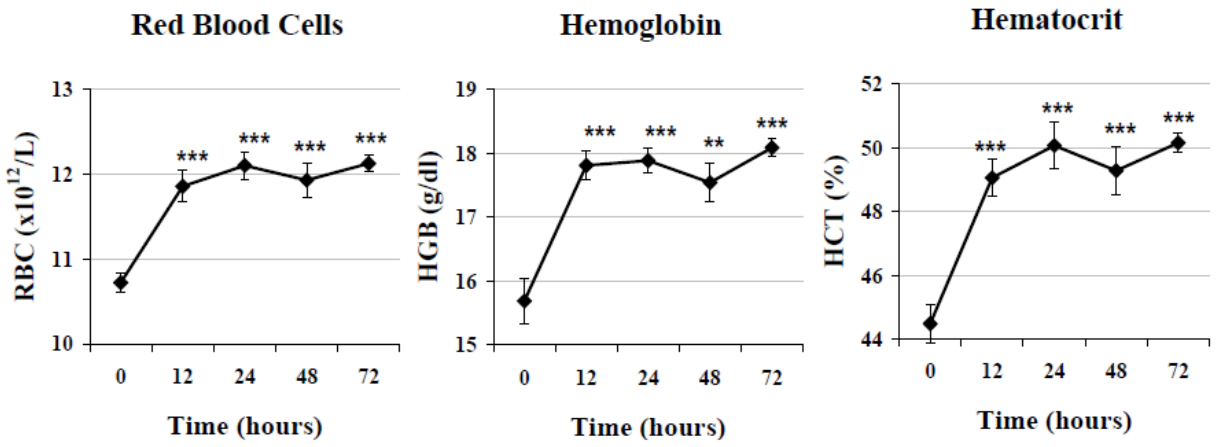

雄 C57BL/6 マウス（n = 8～9）に 0、0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg の luspatercept を週 2 回、8 週間皮下投与し、Day 56 における赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）を測定した結果、各パラメータ共に用量依存的な増加が認められた。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
*** P < 0.001 vs. 溶媒（リン酸緩衝生理食塩液）対照群、### P < 0.001 vs. 3 mg/kg 投与群
出典：M4.2.1.1-4

なお、マウスに 10 mg/kg の用量で luspatercept を単回腹腔内投与した場合、赤血球パラメータの増加は投与後 12 時間で統計学的有意となり、その後も同程度で持続した（M4.2.1.1-5）（Figure 2.2.1.1-2）。



Approved v3.0

**Figure 2.2.1.1-2:** **マウスに luspatercept を腹腔内投与した時の赤血球パラメータ増加の短期的経時変化**




雄 C57BL/6 マウス（n = 6～8）に luspatercept（10 mg/kg）を単回腹腔内投与し、投与後 12、24、48 及び 72 時間の時点における赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値を計測した。Luspatercept 投与群（計 4 群）は、luspatercept を投与するタイミングが血液サンプル採取の 72 時間前、48 時間前、24 時間前及び 12 時間前のいずれか 1 回となるように群ごとに予め設定し、残りの 3 回は溶媒［トリス緩衝生理食塩液（TBS）］を投与した（すべての動物に計 4 回投与した）。なお、すべての時点で溶媒を投与する溶媒対照群も設け、その測定値を図中の Time = 0 として示している。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
*** P ≤ 0.001、** P ≤ 0.01 vs. 溶媒対照群（Time = 0）
出典：M4.2.1.1-5

Luspatercept の薬力学的作用はカニクイザルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験［試験番号 WHH00067（M4.2.3.2-3）］でも検討されている（【M2.6.6、3.2.1 項】参照）。本試験ではカニクイザルに luspatercept を 0、0.4、2、10 及び 30 mg/kg の用量で皮下投与（Day 1 及び Day 15）したときの薬力学的作用（赤血球パラメータに対する増加作用）及び毒性を評価しており、最低用量の 0.4 mg/kg から薬力学的作用が発現し、2 mg/kg で最大反応に達することが確認された。また、いずれの用量においても本薬投与に起因した異常な臨床症状や摂餌量、体重及び臓器重量に対する影響並びに心電図学的、神経学的、生理学的及び病理学的異常所見は認められず、無毒性量は最高用量の 30 mg/kg であったと結論付けている。

上記の毒性試験に加えて、カニクイザルに 10 mg/kg（雌雄各 4 匹）の用量で luspatercept を Day 1 及び Day 8 に皮下投与する薬理試験を実施した[22]。その結果、luspatercept 投与による赤血球パラメータの増加が認められ、これらの影響は Day 3 までに観察され始め、Day 44 まで持続した。網状赤血球数の増加も認められた。また、骨髄塗抹標本の分析により、luspatercept 投与に関連した骨髄の赤血球系細胞数の増加が認められ、赤血球産生の亢進が示唆された。なお、本試験では被験動物の一般状態、体重、摂餌量、白血球数及び血液生化学的パラメータ等に luspatercept 投与による変化は認められなかった。



Approved v3.0

#### 2.2.1.2 赤血球半減期に対する影響

［試験番号 PPR074（M4.2.1.1-6）］

マウスにおける赤血球の半減期に対する RAP-536 の影響を検討した。本試験では、既に存在する赤血球（＝RAP-536 の非存在下で産生された赤血球）及び RAP-536 の存在下で産生された赤血球の半減期に及ぼす RAP-536 の影響をそれぞれ検討した。また、EPO の同半減期に対する影響を、同じ条件下（すなわち、既に存在する赤血球又は EPO 存在下で産生された赤血球のいずれか）で検討した。

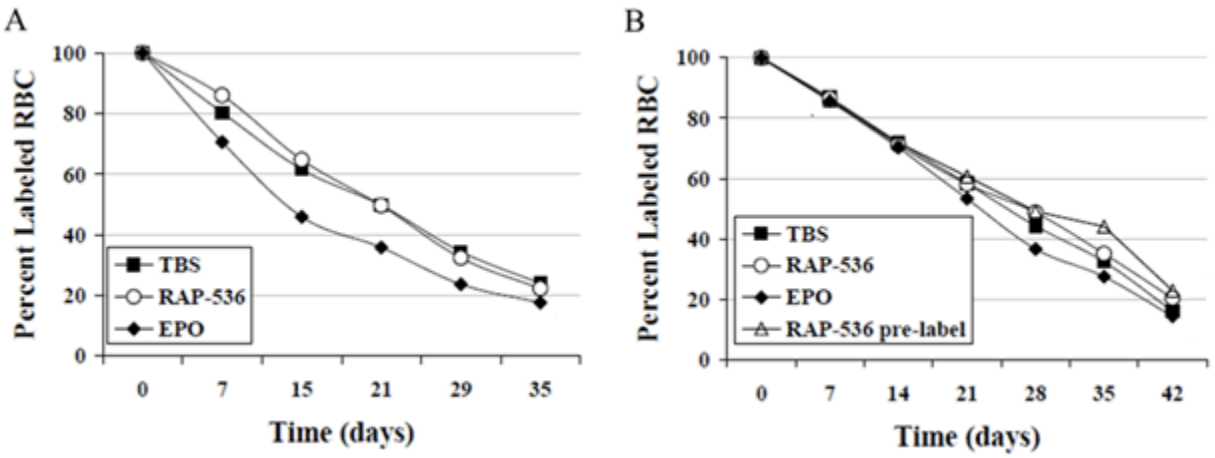
まず、既に存在する赤血球に対する EPO と RAP-536 の作用を調べるために、マウス（5 匹/群）の赤血球を in vivo でビオチン標識を開始して 2 日後に溶媒（TBS）を週 3 回、RAP-536（10 mg/kg）を週 2 回又は EPO（1500 単位/kg）を週 3 回反復皮下投与（投与期間：5 週間）した。週 1 回の頻度で採取した血液試料中の赤血球パラメータ及び標識赤血球数を測定し、半減期を算出した。その結果、RAP-536 は赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）をこれまでに一貫して得られている結果と同様に増加させ（それぞれ 19%、13%及び 12%、$P < 0.01$）、EPO もこれらの値をそれぞれ 51%、53%及び 50%増加させた（$P < 0.001$）。ビオチン標識赤血球数の経時的変化を基に回帰直線解析を行い赤血球半減期を算出したところ、溶媒対照群、RAP-536 投与群及び EPO 投与群でそれぞれ 21.8、21.8 及び 17.4 日となり、RAP-536 は既に存在する赤血球の半減期に影響を及ぼさないことが明らかとなった（Figure 2.2.1.2-1A）。

次に、RAP-536 の存在下で産生された赤血球への影響を調べるために、赤血球のビオチン標識の前後約 6 週間に薬物投与する試験を行った。その結果、RAP-536 投与群では赤血球パラメータの増加の程度は先の試験と同程度であったが（それぞれ 20%、16%及び 12%）、溶媒投与群と比較して統計学的有意ではなかった。一方、EPO 投与群ではこれらのパラメータをそれぞれ 73%、86%及び 86%増加させ［統計学的有意差あり（$P < 0.001$）］、ビオチン標識の前にのみ RAP-536 を投与した群ではそれぞれ 25%、25%及び 21%増加させた（統計学的有意差なし）。溶媒、RAP-536、EPO 及び RAP-536（ビオチン標識前のみ）を投与した群の赤血球半減期はそれぞれ 25.3、26.4、23.6 及び 28.2 日であった（Figure 2.2.1.2-1B）。



Approved v3.0

**Figure 2.2.1.2-1:　　赤血球半減期に対する RAP-536 及びエリスロポエチンの影響**




A：赤血球をビオチン標識した雄 C57BL/6 マウス（n = 5）に溶媒（TBS）又は EPO（1500 単位/kg）を週 3 回、あるいは RAP-536（10 mg/kg）を週 2 回の頻度で 5 週間皮下投与した。週 1 回の頻度で血液試料を採取し、標識赤血球数を測定した。RAP-536 は既に存在する赤血球の半減期に影響を及ぼさなかった。また、EPO 投与群の赤血球半減期は、RAP-536 投与群及び溶媒対照群の同半減期と比較して統計学的有意（P < 0.001）に短かった。
B：雄 C57BL/6 マウス（n = 3～5）に薬物皮下投与（用量及び投与頻度は A と同じ）を開始した 45 日後及び 46 日後（Time = -2, and -1 days）に赤血球ビオチン標識を施し、さらに試験終了まで 6 週間薬物投与を継続した（RAP-536 pre-label 群だけはビオチン標識後の薬物投与は行わず）。Time = 0 days から週 1 回の頻度で血液試料を採取し、標識赤血球数を測定した。RAP-536 投与群と溶媒対照群の赤血球半減期に統計学的有意差は認められなかった。一方、溶媒対照群と比較して、EPO 投与群では赤血球半減期は短く、RAP-536 pre-label 群では同半減期は長かった［共に統計学的有意差（P < 0.05）あり］。また、RAP-536 pre-label 群の赤血球半減期は EPO 投与群のそれより統計学的有意（P < 0.05）に長かった。
上記 A 及び B 共に、統計解析は non-paired Student's t-test を用いた。
出典：M4.2.1.1-6

以上のように、ビオチン標識後に RAP-536 を投与した正常マウスでは、（RAP-536 非存在下で産生した）赤血球の半減期に対する RAP-536 の影響は認められず、さらに、ビオチン標識の前後に RAP-536 を投与した場合でも、（RAP-536 存在下で産生した）赤血球の半減期に影響は認められなかった。一方、EPO 投与群の場合、いずれの標識タイミングでも赤血球半減期の短縮が認められたが、これは赤血球数の増加とそれに伴うビオチン標識赤血球数の相対的減少により、見かけ上、赤血球半減期が短くなった可能性がある。さらに、ビオチン標識前にのみ RAP-536 を投与した群（＝RAP-536 pre-label）では、その赤血球半減期は溶媒対照群と比較して統計学的有意に長かった。なお、溶媒対照群にはビオチン標識後にも溶媒を投与したが、RAP-536 pre-label 群ではビオチン標識後に溶媒を投与せず、厳密な意味での比較対照ではなかった。したがって、このような溶媒投与の違いが赤血球半減期のわずかな差を生み出した可能性も完全には否定できない。



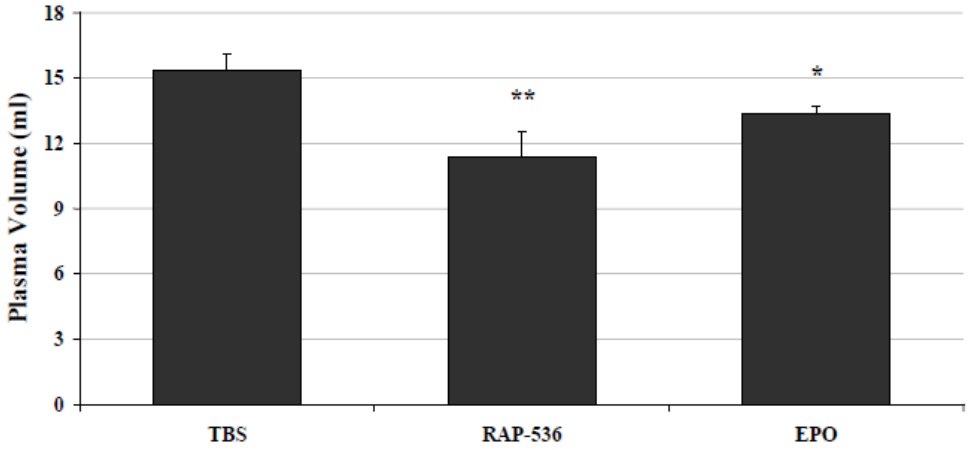
Approved v3.0

### 2.2.1.3 血漿量に対する作用

［試験番号 PPR080（M4.2.1.1-7）］

RAP-536 及び EPO の血漿量に対する影響を検討した。Sprague Dawley ラットに RAP-536（10 mg/kg）若しくは溶媒（TBS）を Day 0 及び Day 4 に、又は EPO（1000 単位/kg）を Day 0、Day 2 及び Day 4 に皮下投与し、Day 7 に血漿量を算出した。その結果、血漿量は RAP-536 投与により 26%、EPO 投与により 13%減少した（Figure 2.2.1.3-1）。RAP-536 投与群で観察された影響は、RAP-536 が血液量へ影響を及ぼさずに赤血球数を増加させた結果（＝ヘマトクリット値の上昇）により生じたと考えられる。なお、同様の影響が EPO を投与したヒトにおいて報告されている[23]。

**Figure 2.2.1.3-1: 血漿量に及ぼす RAP-536 の影響**




雄 Sprague Dawley ラット（n = 5～6）に溶媒（TBS）又は RAP-536（10 mg/kg）を 2 回（Day 0, 4）、あるいは EPO（1000 単位/kg）を 3 回（Day 0, 2, 4）皮下投与し、それぞれ Day 7 における血漿量を 10 分間の cardiogreen dye クリアランス速度に基づいて算出した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
** P ≤ 0.01、* P ≤ 0.05 vs. 溶媒対照群
出典：M4.2.1.1-7

### 2.2.1.4 骨髄及び脾臓における赤血球前駆細胞集団に対する影響

［試験番号 Suragani, 2014（M4.2.1.1-8）及び ACL04（M4.2.1.1-9）］

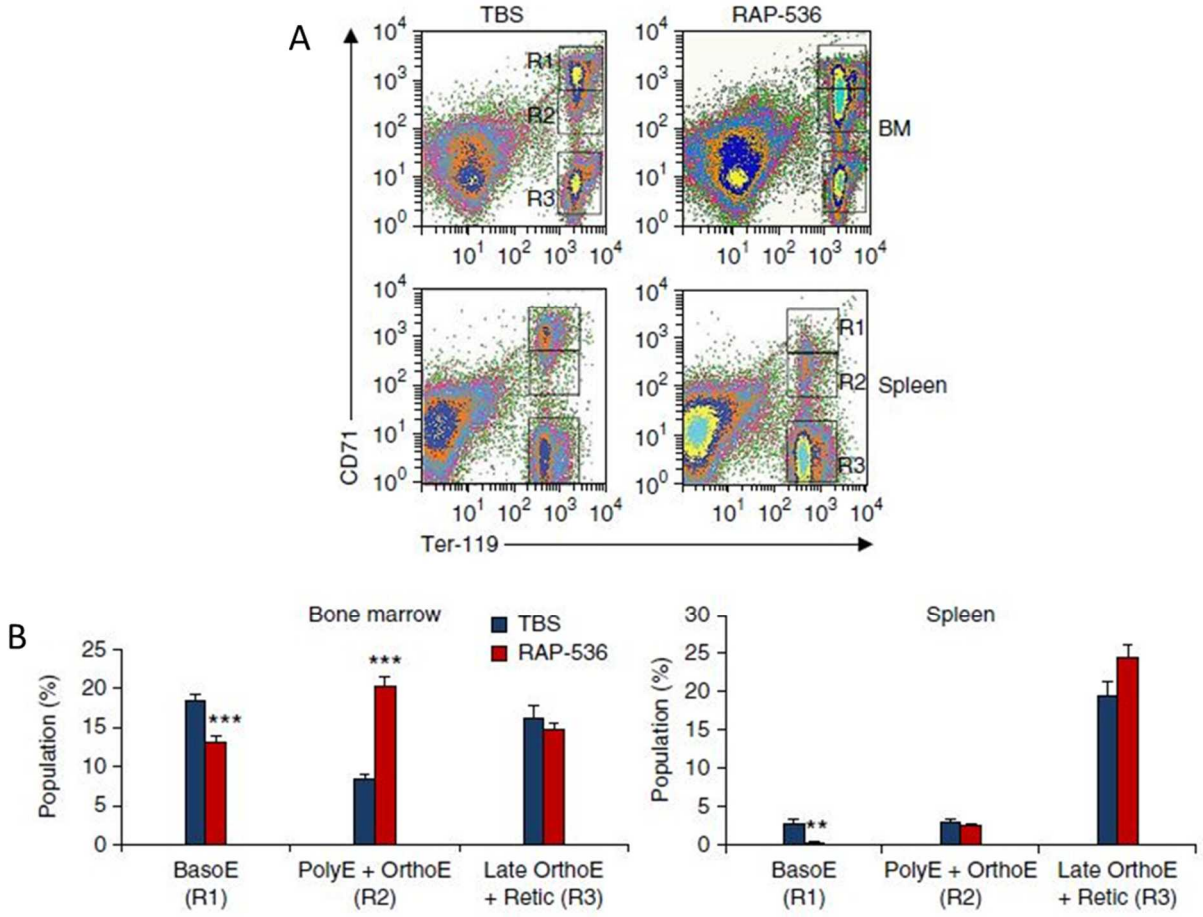
骨髄及び脾臓に存在する赤血球前駆細胞集団に対する RAP-536 の in vivo 作用を、フローサイトメトリー解析及びクローン原性アッセイ法を用いて評価した（M4.2.1.1-8）。なお、ここで用いたクローン原性アッセイ法では、メチルセルロースベース培地に大腿骨骨髄細胞及び脾臓細胞を播種し、骨髄及び脾臓中の赤血球系及び骨髄系前駆細胞数を評価した。



Approved v3.0

最初に、雄マウスに RAP-536 を 10 mg/kg の用量で単回皮下投与した 72 時間後に、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 関連タンパク質）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った（Figure 2.2.1.4-1A）。すなわち、Ter119 及び CD71 に対する抗体を用いて、赤血球前駆細胞集団を好塩基性赤芽球［BasoE（R1）］、多染性赤芽球＋正染性赤芽球［PolyE + OrthoE（R2）］、後期正染性及び網状赤血球［Late OrthoE + Retic（R3）］を分取した。その結果、RAP-536 投与の 72 時間後には骨髄及び脾臓ともに Baso E（R1）が減少し、さらに骨髄では PolyE + OrthoE（R2）が増加した（溶媒投与群との比較、Figure 2.2.1.4-1B）。

**Figure 2.2.1.4-1:　　マウス赤血球前駆細胞集団に対する RAP-536 の影響**




BM：骨髄
溶媒（TBS）又は RAP-536（10 mg/kg）を雄 C57BL/6 マウスに単回皮下投与した（n = 5）。
A　投与 72 時間後に採取した骨髄検体及び脾臓検体の CD71 及び Ter119 フローサイトメトリードットプロット（代表例）を示す。R1 は BasoE、R2 は PolyE + OrthoE、R3 は Late OrthoE + Retic に該当する。
B　A で分取した各赤血球前駆細胞集団の割合を百分率（平均値 ± 標準誤差）で示す。** P < 0.01、*** P < 0.001 vs. 溶媒対照群（nonpaired Student's t-test）
出典：M4.2.1.1-8



Approved v3.0

続いて、雌マウスに RAP-536 を 2 回皮下投与（10 mg/kg、Day 1 及び Day 3）したときの、Day 9 の赤血球系及び骨髄系前駆細胞集団に対する影響を評価した（M4.2.1.1-9）。その結果、溶媒対照群と RAP-536 投与群との間で大腿骨及び脾臓の有核細胞数に差は認められなかった（データ示さず）。RAP-536 投与マウスの大腿骨では溶媒対照群との比較で、1 ディッシュあたりの CFU-E のコロニー数、頻度（1 コロニー形成細胞を得るために必要な有核細胞数）及び大腿骨 1 本あたりの総 CFU-E に統計学的有意な減少が認められた。また、1 ディッシュあたりの顆粒球・マクロファージコロニー形成細胞（CFU-GM）コロニー数及び総コロニー形成細胞（CFC）コロニー数並びに頻度にも統計学的有意な減少が認められた（Table 2.2.1.4-1）。

脾臓では、1 ディッシュあたりの CFU-E 及び BFU-E のコロニー数、頻度並びに脾臓 1 臓器あたりの総 CFU-E に、RAP-536 投与による統計学的有意な増加が認められた（Table 2.2.1.4-1）。なお、全被験マウスから採取した造血コロニーの形態はすべて正常であった。

**Table 2.2.1.4-1: 大腿骨及び脾臓の赤血球前駆細胞に対する RAP-536 の影響**

| 測定項目 | 測定値及び計算値（平均値 ± 標準偏差、n = 8） | |
|---|---|---|
| | 溶媒投与群 | RAP-536 投与群 |
| 大腿骨骨髄 | | |
| 1 ディッシュあたりの CFU-E コロニー数 | 279 ± 125 | 141 ± 33$^{\$(**)}$ |
| CFU-E の頻度 | 1:660 ± 884 | 1:754 ± 185$^{(**)}$ |
| 大腿骨 1 本あたりの総 CFU-E | 42277 ± 18879 | 26461 ± 8008$^{(*)}$ |
| 1 ディッシュあたりの BFU-E コロニー数 | 10 ± 2 | 7 ± 2 |
| BFU-E の頻度 | 1:3071 ± 679 | 1:4902 ± 1644 |
| 大腿骨 1 本あたりの総 BFU-E | 5444 ± 1518 | 4559 ± 1776 |
| 1 ディッシュあたりの CFU-GM コロニー数 | 83 ± 6 | 67 ± 8** |
| CFU-GM の頻度 | 1:364 ± 27 | 1:458 ± 59* |
| 大腿骨 1 本あたりの総 CFU-GM | 43383 ± 8777 | 41976 ± 9311 |
| 1 ディッシュあたりの CFC コロニー数 | 95 ± 7 | 75 ± 9** |
| CFC の頻度 | 1:318 ± 25 | 1:412 ± 57$^{\#}$ |
| 大腿骨 1 本あたりの総 CFC | 49684 ± 9873 | 46873 ± 10977 |



Approved v3.0

**Table 2.2.1.4-1: 大腿骨及び脾臓の赤血球前駆細胞に対する RAP-536 の影響**

| 測定項目 | 測定値及び計算値（平均値 ± 標準偏差、n = 8） | |
|---|---|---|
| | 溶媒投与群 | RAP-536 投与群 |
| 脾臓 | | |
| 1 ディッシュあたりの CFU-E コロニー数 | 42 ± 15 | 157 ± 50## |
| CFU-E の頻度 | 1:8170 ± 2906 | 1:2130 ± 721##(**) |
| 脾臓 1 臓器あたりの総 CFU-E | 15435 ± 7184 | 55421 ± 23055**(#) |
| 1 ディッシュあたりの BFU-E コロニー数 | 15 ± 3 | 21 ± 4* |
| BFU-E の頻度 | 1:14725 ± 3499 | 1:10040 ± 1694* |
| 脾臓 1 臓器あたりの総 BFU-E | 8140 ± 2200 | 10836 ± 2152 |
| 1 ディッシュあたりの CFU-GM コロニー数 | 20 ± 5 | 25 ± 5 |
| CFU-GM の頻度 | 1:10833 ± 2657 | 1:8679 ± 2022 |
| 脾臓 1 臓器あたりの総 CFU-GM | 11125 ± 3818 | 12903 ± 3735 |
| 1 ディッシュあたりの CFU-GEMM コロニー数 | 0 ± 1 | 1 ± 1 |
| 1 ディッシュあたりの CFC コロニー数 | 36 ± 8 | 46 ± 8 |
| CFC の頻度 | 1:5970 ± 1231 | 1:4509 ± 773 |
| 脾臓 1 臓器あたりの総 CFC | 19492 ± 5918 | 24027 ± 5710 |

CFU-GEMM：顆粒球・赤芽球・単球・巨核球コロニー形成細胞（骨髄系共通前駆細胞）
雌 BDF1 マウスに RAP-536 を 2 回皮下投与（10 mg/kg、Day 1, 3）したときの、Day 8 の赤血球系及び骨髄系前駆細胞集団に対する影響を評価した。括弧内の統計学的記号は外れ値と判断したマウス 1 匹を除いて算出した溶媒対照群値と比較したときの、また、括弧外の統計学的記号はすべてのマウスを対象にして算出した溶媒対照群値と比較したときの統計学的有意性を示す。
$ P < 0.01、* P < 0.005、# P < 0.001、** P < 0.0005、## P < 0.0001 vs. 溶媒（TBS）対照群（Standard t-tests）
出典：M4.2.1.1-9 より改変

なお、別の試験[24]では、luspatercept の 2 回腹腔内投与（10 mg/kg、Day 0 及び Day 3）により、Day 7 の骨髄中 BFU-E 及び CFU-E 数に統計学的有意な変化は認められなかった。しかしながら、ACL04 試験と同様に、脾臓の CFU-E 数は統計学的有意に増加した。

上記 2 試験の骨髄細胞に対する影響より、RAP-536 が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。また、脾臓では BFU-E 及び CFU-E の増加が認められた。マウスでは、脾臓が適応的赤血球新生（例えば、ストレスに惹起される赤血球新生など）の主要な部位であるため[25]、



Approved v3.0

RAP-536 投与後にみられた脾臓での変化は、本薬によって赤血球新生が全身性に亢進したことを反映するものと思われる。一方、骨髄での赤血球新生については、そのほとんどは恒常性維持が目的である。したがって、（ACL04 試験でのみ認められた）RAP-536 投与による骨髄での CFU-E の減少は、RAP-536 の直接作用ではなく、フィードバック機構（例えば、EPO 値の低下など。2.2.1.5 項参照）に起因した可能性が考えられる。

Luspatercept（10 mg/kg）を単回皮下投与したマウスにおいて、骨髄 BFU-E 及び CFU-E が溶媒対照群と比較して低下する（投与後 48 時間）ことも明らかとなっている [14]。

### 2.2.1.5 内因性エリスロポエチン産生に対する影響

［試験番号 PPR065（M4.2.1.1-5）、PPR084（M4.2.1.1-10）、
PPR083（M4.2.1.1-11）及び PPR087（M4.2.1.1-12）］

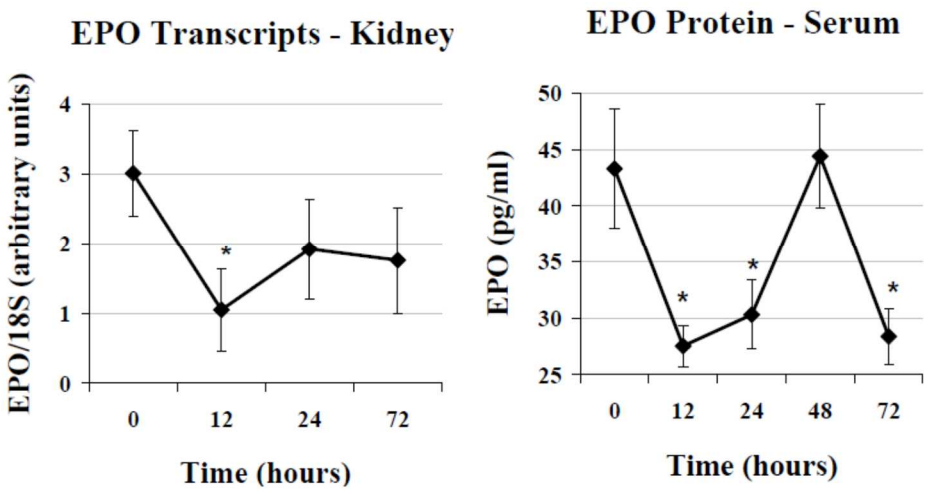
内因性に産生される EPO が luspatercept 投与によって影響を受けるか否かを確認する試験を実施した。

腎臓中 EPO 転写産物発現量及び血清 EPO 濃度は、luspatercept（10 mg/kg）単回腹腔内投与の 12 時間後までに低下した（M4.2.1.1-5）。すなわち、腎臓の EPO 転写産物発現量は、luspatercept 投与後すべての測定時点で低下したが、統計学的有意であったのは 12 時間後のみであった（Figure 2.2.1.5-1 左）。また、血清 EPO 濃度は投与 48 時間後の時点を除くすべての測定時点で統計学的有意に低下した（Figure 2.2.1.5-1 右）。



Approved v3.0

**Figure 2.2.1.5-1:** **Luspatercept 投与による腎臓及び血清におけるエリスロポエチンレベルの変化**




雄マウス（n = 7～8）に luspatercept（10 mg/kg）を単回腹腔内投与した 12、24 及び 72 時間後に、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を用いて腎臓における EPO 転写産物発現量（内部標準として 18S リボソームリボ核酸を用いた）を、また、同 12、24、48 及び 72 時間後に Mesoscale Discovery 社製 MULTI-SPOT® アッセイを用いて血清 EPO 濃度を測定した。すべての動物に計 4 回投与を行い、そのうち 1 回は指定時間に luspatercept を、残りの 3 回は溶媒（TBS）を腹腔内投与した。溶媒対照群はすべての時点で TBS を腹腔内投与し（計 4 回）、図中には Time = 0 として示した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
* P ≤ 0.05 vs. 溶媒対照群
出典：M4.2.1.1-5

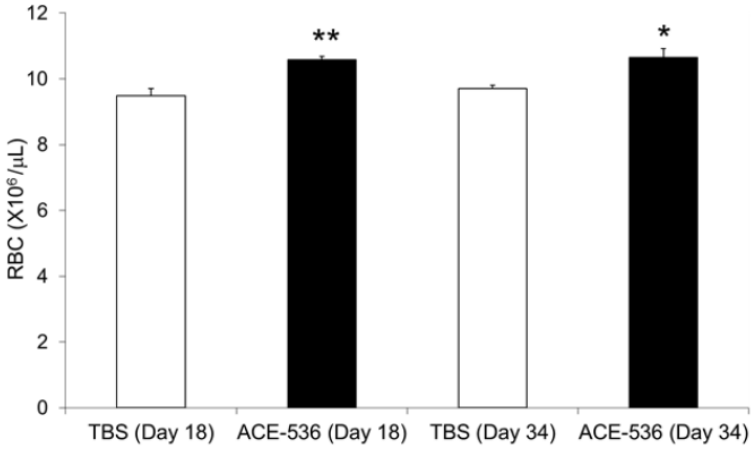
本試験において luspatercept は投与後 12 時間の時点で EPO レベルを低下させたが、同時点ですでに赤血球パラメータを統計学的有意に増加させており（Figure 2.2.1.1-2 参照）、luspatercept の早期に現れる薬理作用は EPO 非依存的に生じることが示唆された。EPO レベルの低下は、赤血球数の増加に連動した負のフィードバック機構である可能性が考えられる。

別の試験では、マウスに luspatercept（10 mg/kg）を Day 0 及び Day 4 に 2 回皮下投与することで赤血球数の増加が認められ、この増加は少なくとも Day 34 までは持続した（Figure 2.2.1.5-2）（M4.2.1.1-10）。Luspatercept の 2 回目投与後 14 日（Day 18）の時点で、血清 EPO 濃度（89 pg/mL）は溶媒対照群のそれ（42 pg/mL）と比較して上昇し、その後、2 回目投与後 30 日（Day 34）までに溶媒対照群と同レベルにまで低下した（Figure 2.2.1.5-3）。



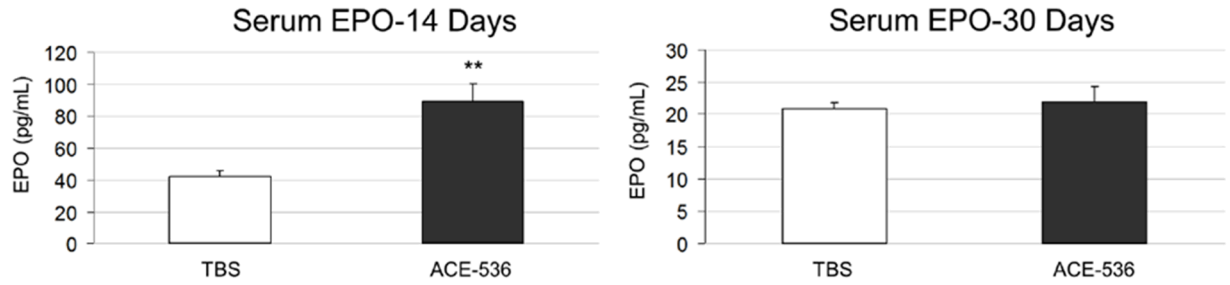
Approved v3.0

**Figure 2.2.1.5-2: Luspatercept のマウス赤血球数増加作用の持続性**




Day 0 及び Day 4 に雄マウス（n = 5）に luspatercept（10 mg/kg）又は溶媒（TBS）を皮下投与し、Day 18（2 回目投与の 14 日後）及び Day 34（2 回目投与の 30 日後）に赤血球数を測定した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
* P < 0.05、** P < 0.01 vs. 溶媒対照群
出典：M4.2.1.1-10

**Figure 2.2.1.5-3: Luspatercept によるマウス血清エリスロポエチンレベル変化の持続性**




Day 0 及び Day 4 に雄マウス（n = 5）に luspatercept（10 mg/kg）又は溶媒（TBS）を皮下投与し、2 回目投与の 14 日後（左図）及び 30 日後（右図）に血清 EPO 濃度を ELISA 法により測定した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
** P < 0.01 vs. 溶媒対照群
出典：M4.2.1.1-10

上記の 2 回目投与の 14 日後に認められた血清 EPO 濃度の増加は比較的軽度であり、これは赤血球産生経路が進行することで減少した前駆細胞を補充する反応が代償性に生じた可能性が考えられる。

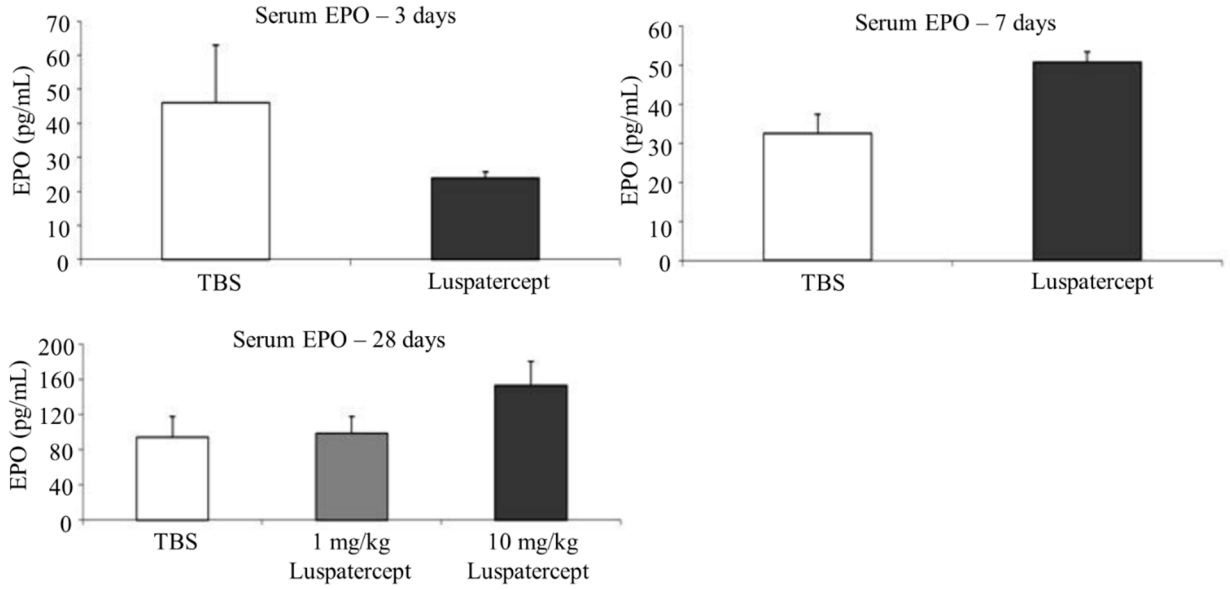
血清 EPO 濃度に対する luspatercept 長期投与の影響を明らかにする目的で、マウスに luspatercept（10 mg/kg）を週 2 回の頻度で 3、7 及び 28 日間皮下投与した（M4.2.1.1-11）。なお、luspatercept（1 mg/kg）を週 2 回、28 日間皮下投与する群も設けた。その結果、すべての luspatercept 投与群で赤血球パラメータの増加が認められた。一方、血清 EPO 濃度については、3 日間投与では溶媒対照群



Approved v3.0

と比較して減少傾向が認められたが、7 日間投与では増加傾向を示した（いずれも統計学的有意差なし）。また、28 日間投与においては 10 mg/kg 投与群で溶媒対照群よりも増加傾向を示したが（統計学的有意差なし）、1 mg/kg 投与群では溶媒対照群と同程度であった（Figure 2.2.1.5-4）。

**Figure 2.2.1.5-4:　　血清エリスロポエチン濃度に対する luspatercept 長期投与の影響**



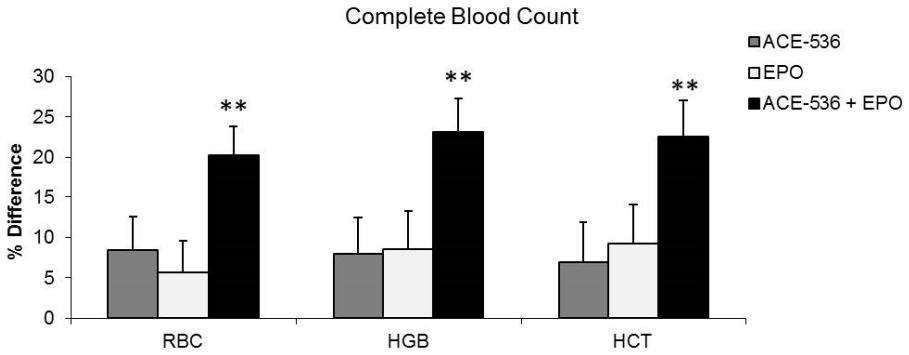

雄マウス（n = 5）に luspatercept（1 及び 10 mg/kg）又は溶媒対照（TBS）を週 2 回の頻度で 3、7 又は 28 日間皮下投与した後に（1 mg/kg は 28 日間投与のみ）、MesoScale Discovery キットを用いた ELISA 法により血清 EPO 濃度を測定した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
出典：M4.2.1.1-11 より改変

Luspatercept と EPO は、分化成熟度が異なる細胞集団を標的とするため、luspatercept と EPO を併用投与することでそれぞれの単独投与時と比較して赤血球数増加作用が増強されることが期待される。そこで、マウスに luspatercept（10 mg/kg）及び EPO（1800 単位/kg）を単独又は併用により単回腹腔内投与したところ（M4.2.1.1-12）、投与 3 日後の時点において、両薬物の併用投与群では、溶媒投与群と比較して赤血球数（20.3%）、ヘモグロビン濃度（23.1%）及びヘマトクリット値（22.5%）の増加が認められ、これらは両薬物の単独投与群における反応よりも大きいものであった（Figure 2.2.1.5-5）。



Approved v3.0

**Figure 2.2.1.5-5:** **マウス赤血球パラメータに対する luspatercept とエリスロポエチンの増加作用における併用投与の影響**




HCT：ヘマトクリット値、HGB：ヘモグロビン濃度
雄マウス（n = 4）に luspatercept（10 mg/kg）及び EPO（1800 単位/kg）を腹腔内投与した 72 時間後に各赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）を測定し、溶媒（TBS）対照群との差を溶媒対照群の値に対する百分率（%）で示した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
** $P \leq 0.01$ vs. EPO 単独投与群
出典：M4.2.1.1-12

### 2.2.1.6 Luspatercept が有する赤血球パラメータに対する作用のエリスロポエチン非依存性

［試験番号 PPR063（M4.2.1.1-13）及び PPR088（M4.2.1.1-14）］

抗 EPO モノクローナル抗体（mAb）により EPO を捕捉することで赤血球産生を低下させる試験条件を用いて、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、Table 2.2.1.6-1 に示す投薬スケジュールに従ってマウスに luspatercept（10 mg/kg）及び抗 EPO mAb（5.5 mg/kg）を投与する試験を実施した（M4.2.1.1-13）。



Approved v3.0

**Table 2.2.1.6-1: Luspatercept の赤血球パラメータに対する作用がエリスロポエチンに依存するか否かを検討する試験の投与デザイン（試験日別の投与薬物と試験終了日）**

| 群 No. | Day 0 | Day 2 | Day 4 | Day 6 | Day 7 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | TBS | TBS | 終了 | ― | ― |
| 2 | luspatercept | TBS | 終了 | ― | ― |
| 3 | 抗 EPO mAb | 抗 EPO mAb | 終了 | ― | ― |
| 4 | luspatercept+<br>抗 EPO mAb | 抗 EPO mAb | 終了 | ― | ― |
| 5 | TBS | TBS | TBS | TBS | 終了 |
| 6 | luspatercept | TBS | luspatercept | TBS | 終了 |
| 7 | 抗 EPO mAb | 抗 EPO mAb | 抗 EPO mAb | 抗 EPO mAb | 終了 |
| 8 | luspatercept+<br>抗 EPO mAb | 抗 EPO mAb | luspatercept+<br>抗 EPO mAb | 抗 EPO mAb | 終了 |

各日における投与回数はそれぞれ 1 日 1 回とし、終了日に赤血球パラメータ及びエリスロポエチンレベルを測定した。
出典：M4.2.1.1-13

Day 4 に試験を終了した群（No.1～4）では、溶媒対照群（No.1）と比較して、luspatercept 投与群（No.2）で赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）がそれぞれ 9%、8%及び 6%、統計学的有意に高かったが、抗 EPO mAb 投与群（No.3）では同パラメータはそれぞれ 11%、14%及び 11%、統計学的有意に低かった。一方、luspatercept と抗 EPO mAb の併用投与群（No.4）では、上記の抗 EPO mAb による赤血球パラメータの低下は回復した。すなわち、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値で溶媒対照群との統計学的有意差はなくなり、赤血球数は統計学的有意に高かった（Figure 2.2.1.6-1A）。

Day 7 に試験を終了した群（No.5～8）では、溶媒対照群（No.5）と比較して、luspatercept 投与群（No.6）の赤血球パラメータは依然として統計学的有意に高く、また、抗 EPO mAb 投与群（No.7）でも依然として統計学的有意に低かった。しかしながら、Day 4 に終了した併用投与群（No.4）で認められた luspatercept の抗 EPO mAb の作用に対する回復効果は、Day 7 に終了した併用投与群（No.8）では減弱した。すなわち、赤血球数及びヘマトクリット値では溶媒対照群と統計学的有意差がなく、ヘモグロビン濃度は統計学的有意に低かった（Figure 2.2.1.6-1A）。

腎臓での EPO 転写産物発現量及び血清 EPO 濃度は、抗 EPO mAb 単独投与の Day 4 終了群（No.3）と Day 7 終了群（No.7）で溶媒対照群と比較して統計学的有意に増加したことから、赤血球数を維持するためのフィードバック機構が mAb による EPO 捕捉に反応して生じたことが考えられた。Luspatercept 単独投与において、EPO 転写産物発現量は Day 4 終了群（No.2）の時点では変化してい



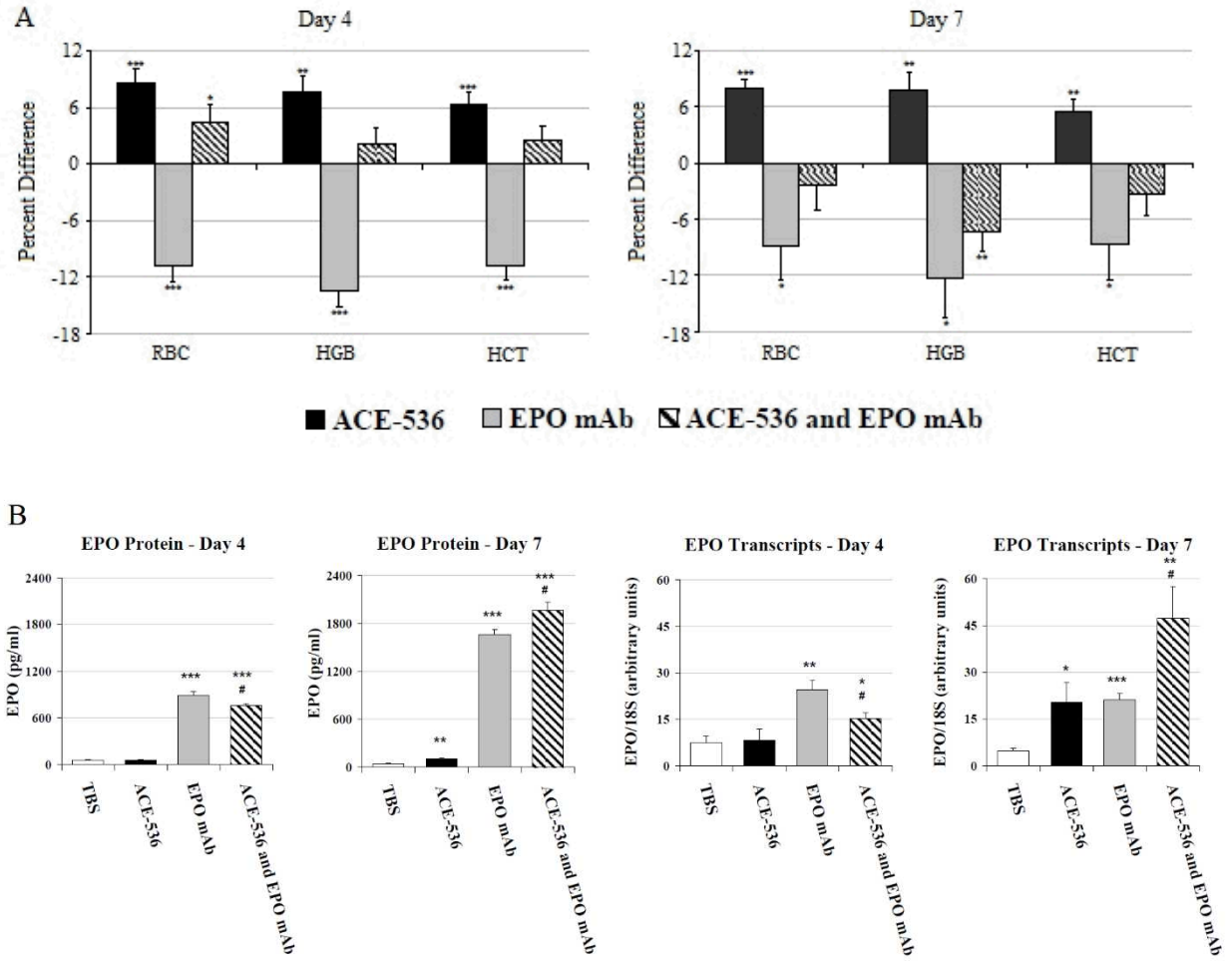
Approved v3.0

なかったが、Day 7 終了群（No.6）では統計学的有意に増加したことから（いずれも溶媒対照群との比較）（Figure 2.2.1.6-1B）、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、この結果と一致して、luspatercept と抗 EPO mAb の併用投与では EPO 転写産物発現量及び血清 EPO 濃度が抗 EPO mAb 単独投与群と比較して Day 4 終了群（No.4）では減少したものの、Day 7 終了群（No.8）では増加に転じた（いずれも統計学的有意差あり）（Figure 2.2.1.6-1B）。



Approved v3.0

**Figure 2.2.1.6-1:** **Luspatercept 又は抗エリスロポエチンモノクローナル抗体を単独又は併用投与したマウスにおける赤血球パラメータ並びに血清及び腎臓エリスロポエチンレベルの変化**




雄マウス（n = 5）に luspatercept（10 mg/kg）及び抗 EPO mAb（5.5 mg/kg）を Table 2.2.1.6-1 に示すスケジュールに従い腹腔内投与した。
A　Luspatercept 及び抗 EPO mAb を単独又は併用投与し、Day 4 又は Day 7 に測定した赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）の溶媒対照群との差（%）を示す。
B　Figure 2.2.1.5-1 と同一の方法にて測定した血清 EPO 濃度（左側 2 図）及び腎臓中 EPO 転写産物発現量（右側 2 図）に対する、luspatercept 及び抗 EPO mAb の単独又は併用投与の影響を示す。
各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
* $P \leq 0.05$、** $P \leq 0.01$、*** $P \leq 0.001$ vs. 溶媒対照群、# $P \leq 0.05$ vs. 抗 EPO mAb 単独投与群
出典：M4.2.1.1-13 より改変

同様の結果を、マウスに RAP-536（10 mg/kg、皮下投与）及び抗 EPO mAb（120 µg/匹、腹腔内投与）を単独又は併用して投与した試験でも確認している（試験期間を 4 日間又は 9 日間と設定）（M4.2.1.1-14）。本試験では、血清 EPO の影響をあらかじめ阻害する目的で RAP-536 投与開始の 4 日前に抗 EPO mAb 投与を開始した。4 日間試験レジメの RAP-536 単独投与群（Day 0 に単回投与）



Approved v3.0

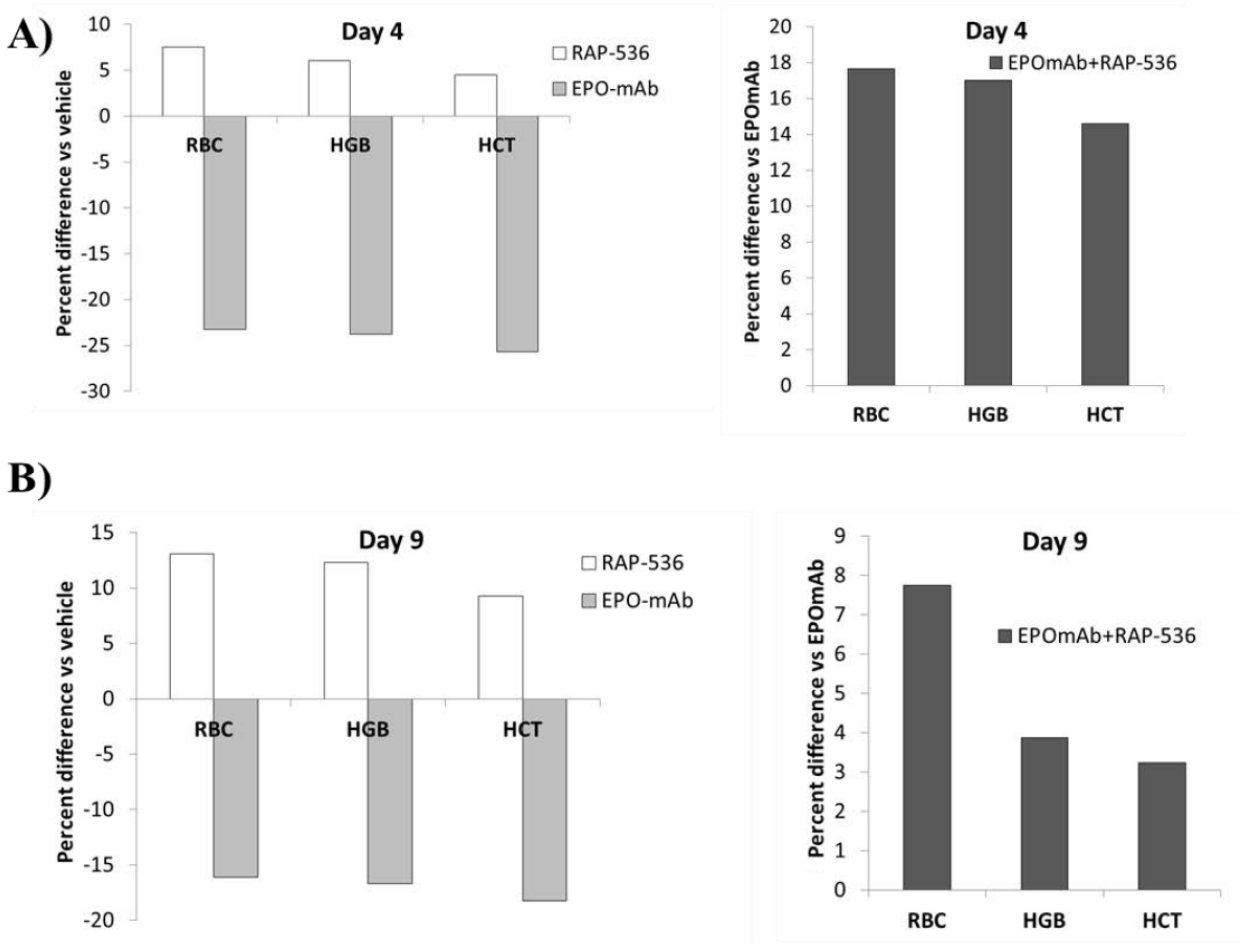
では、Day 4 の時点で赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）がそれぞれ 7.5%、6.03%及び 4.49%増加したが（溶媒投与群との比較）、抗 EPO mAb 単独投与群（Day -4、Day -2、Day 0、Day 2 に投与）では同パラメータはそれぞれ 23.71%、23.81%、25.71%減少した（Figure 2.2.1.6-2A）。抗 EPO mAb 投与後に RAP-536 を併用投与した群では、各赤血球パラメータは抗 EPO mAb 単独投与群に比べて増加し（それぞれ 17.66%、16.99%、14.59%）（Figure 2.2.1.6-2A）、本結果からも赤血球に対する急性の影響は EPO 非依存的であることが示された。

一方、9 日間試験レジメでは、RAP-536 単独投与群（Day 0、Day 2、Day 7 に投与）では同パラメータはそれぞれ 13.1%、12.3%及び 9.26%増加し、抗 EPO mAb 単独投与群（Day -4、Day -2、Day 0、Day 2、Day 4、Day 6、Day 8 に投与）ではそれぞれ 16.12%、16.69%、18.2%減少した（Figure 2.2.1.6-2B）。しかしながら、これら 2 薬物の併用投与群では、抗 EPO mAb 単独群と比較して、同パラメータの増加幅はそれぞれ 7.74%、3.8%、3.2%と 4 日間投与試験の結果と比較して減弱したことから（Figure 2.2.1.6-2B）、RAP-536 の持続的な赤血球産生作用には EPO が関与していることが示唆された。



Approved v3.0

**Figure 2.2.1.6-2:** **RAP-536 又は抗エリスロポエチンモノクローナル抗体を単独又は併用投与したマウスにおける赤血球パラメータの変化**




雄マウス（n = 5）に RAP-536（10 mg/kg、皮下；Day 0）及び抗 EPO mAb（120 µg/匹、腹腔内；Day -4, -2, 0, 2）を単独投与した後の Day 4（A、左図）並びに RAP-536（10 mg/kg、皮下；Day 0, 2, 7）及び抗 EPO mAb（120 µg/匹、腹腔内；Day -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8）を単独投与した後の Day 9（B、左図）における各赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）の溶媒（TBS 及びリン酸緩衝生理食塩水）対照群のそれらに対する百分率（%）を計算しその差分を示した。また、RAP-536 と抗 EPO mAb の併用投与群における各赤血球パラメータに関して、抗 EPO mAb 単独投与群のそれらと比較した変化率の差（%）を A 及び B の右図に示した。
出典：M4.2.1.1-14

以上のように、EPO の作用を遮断することで誘導される赤血球パラメータの低下を luspatercept（又は RAP-536）が抑制することが示された。その一方で、luspatercept（又は RAP-536）の赤血球増加を持続させるためには EPO が必要であった。

以上、正常動物（マウス及びカニクイザル）を用いた試験において、luspatercept（又は RAP-536）の赤芽球の分化成熟度に対する影響や赤血球パラメータの急速かつ持続的な増加作用が認められた。



Approved v3.0

Luspatercept の作用機序は EPO のそれとは異なり、後期赤血球前駆細胞に作用する。また、luspatercept/RAP-536 により EPO が急性的には抑制されるものの、その後増加し、正常化すると考えられる。Luspatercept を投与した動物では、赤血球の形態や細胞寿命に変化は認められなかった。これらの結果は、EPO がより早期の前駆細胞集団を刺激するのに対し、luspatercept は後期赤血球前駆細胞に作用するという理解と一致するものであった。赤芽球集団の分化成熟は luspatercept/RAP-536 により促進されるが、赤血球を持続的に産生するためには EPO によって前駆細胞集団が補充されることが必要となる。

### 2.2.2 骨髄異形成症候群モデルマウスを用いた薬効評価

［試験番号 PPR085（M4.2.1.1-15）及び PPR115（M4.2.1.1-16）］

NUP98 遺伝子を含む 20 以上の染色体転座が複数の造血器悪性腫瘍疾患で同定されており、特に MDS 及び急性骨髄性白血病患者で NUP98-HOXD13（NHD13）融合遺伝子の存在が報告されている。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[26]。このモデルマウスを用いて RAP-536 の薬効を評価した（M4.2.1.1-15）。

NHD13 マウス（4 ヵ月齢）は、背景を一致させた正常マウスと比較して正常な外観を有するが、顕著な血球減少症（特に貧血及び白血球減少）を示す。本試験では、NHD13 マウス及び正常マウス（4 ヵ月齢）に 10 mg/kg の用量で 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。

雄 NHD13 マウスでは、初回投与前（Day 0）の赤血球数［-8.8%、$P < 0.05$（non-paired Student's t-test による検定。以下同じ）］及びヘマトクリット値（-8.4%、$P < 0.05$）が対照の正常同腹仔と比較して統計学的有意に減少していた。一方、雌性 NHD13 マウスでは統計学的有意な貧血症状は認められなかった［赤血球数及びヘマトクリット値の軽度減少のみ（それぞれ-1.1%及び-2.2%）］。

RAP-536 を 1 ヵ月間投与した雄 NHD13 マウスでは、溶媒投与した NHD13 マウスと比較して赤血球数（+9.2%、$P < 0.01$）、ヘモグロビン濃度（+13.1%、$P < 0.01$）及びヘマトクリット値（+10.8%、$P < 0.01$）の統計学的有意な増加が認められた。また、RAP-536 を投与した雌 NHD13 マウスでは、溶媒投与した NHD13 マウスと比較して、赤血球数（+3.0%、$P < 0.05$）及びヘマトクリット値（+4.9%、$P < 0.05$）が統計学的有意に増加した。

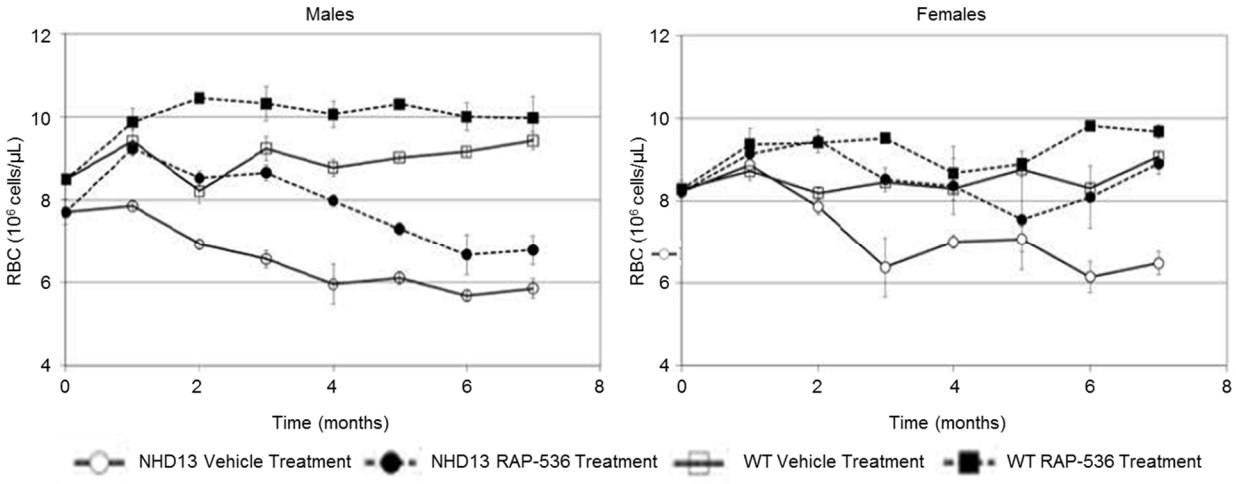
RAP-536 を 4 ヵ月間投与した雄 NHD13 マウスでは、溶媒投与した NHD13 マウスと比較して赤血球数（+25.4%、$P < 0.01$）、ヘモグロビン濃度（+22.8%、$P < 0.01$）及びヘマトクリット値（+21.9%、$P < 0.01$）の統計学的有意な増加が認められ、雌でも同様の結果であった［赤血球数：+16.2%（$P < 0.05$）、ヘモグロビン濃度：+16.9%（$P < 0.01$）、ヘマトクリット値：+18.4%（$P < 0.01$）］。



Approved v3.0

RAP-536 を 7 ヵ月間投与した NHD13 マウスでは、溶媒投与した NHD13 マウスと比較して、雄［赤血球数：+13.8%（P = 0.09）（Figure 2.2.2-1 左）、ヘモグロビン濃度：+19.8%（P < 0.05）、ヘマトクリット値：+14.8%（P = 0.05）］及び雌［赤血球数：+27.2%（P < 0.001）（Figure 2.2.2-1 右）、ヘモグロビン濃度：+21.5%（P < 0.001）、ヘマトクリット値：+22.9%（P < 0.001）］の赤血球パラメータが増加した。一方、すべての NHD13 マウスの白血球数（投与前値）は正常マウスのそれと比較して少なく、また、RAP-536 投与と溶媒投与の NHD13 マウス（雌雄共に）の間に白血球数の差は認められなかった（データ示さず）。

**Figure 2.2.2-1:　　骨髄異形成症候群モデルマウスにおける赤血球数に対する RAP-536 の作用**



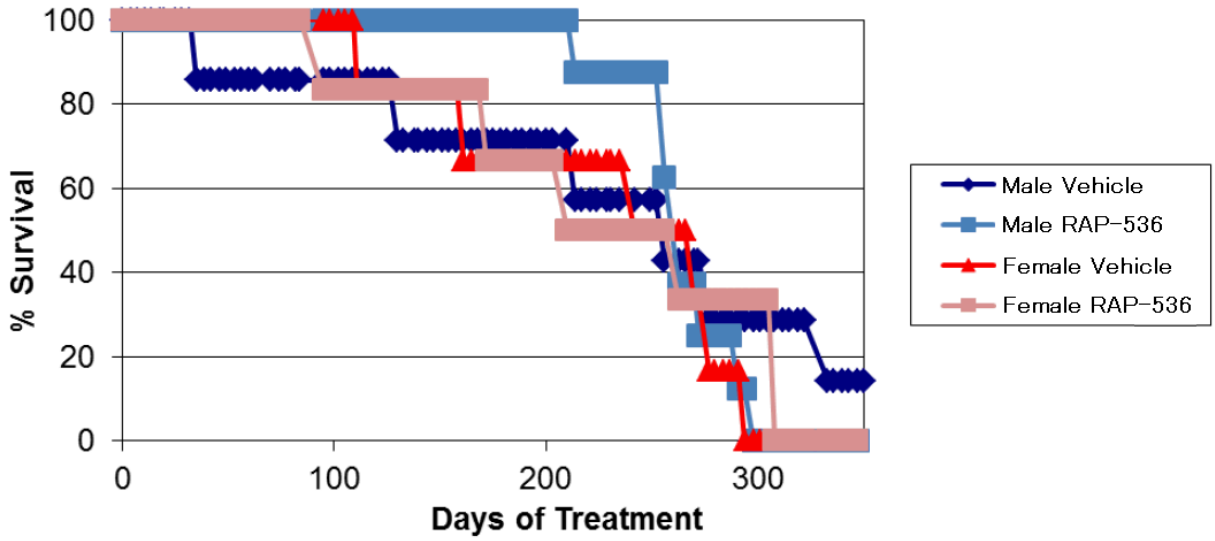

WT：（野生型）正常マウス
雄（左図）及び雌（右図）の NHD13 マウス（n = 6～8）又は正常マウス（n = 7～8）に RAP-536（10 mg/kg）又は溶媒（TBS）を週 2 回、最長 12 ヵ月間皮下投与し、最初の 7 ヵ月間に赤血球数測定を毎月行った。各データは平均値±標準誤差で示した。
出典：M4.2.1.1-15 より改変

最長 12 ヵ月間に及ぶ試験期間を通じて動物の生存能を観察した（Figure 2.2.2-2）。なお、死亡匹数には死亡を発見した匹数に加え瀕死状態のために安楽死させた匹数も含めた。その結果、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 v3.0

**Figure 2.2.2-2:　　骨髄異形成症候群モデルマウスの生存能に対する RAP-536 の影響**




雌雄 NHD13 マウス（n = 6～8）に RAP-536（10 mg/kg）又は溶媒（図中 Vehicle）を週 2 回、最長 12 ヵ月間皮下投与し、生存率（%）を経時的に観察した。
出典：M4.2.1.1-15 より改変

NHD13 マウスを用いた別の試験では、貧血に対する RAP-536 の効果を MDS 進行ステージ別に検討した（M4.2.1.1-16）。RAP-536（10 mg/kg）又は溶媒の週 2 回皮下投与をそれぞれ初期、中期及び後期の MDS 病態を呈する約 4、8 又は 10 ヵ月齢の時点に開始し（以下、それぞれを初期 MDS マウス、中期 MDS マウス及び後期 MDS マウスとする）、8 週間（初期の場合）又は 6 週間（中期及び後期の場合）薬物投与を継続した。また、月齢を一致させた（野生型）正常 FVB マウスを初期病態の対照群として含めた。試験終了時に血液、骨髄及び脾臓を採取し、赤血球パラメータ測定、赤血球の分化成熟度解析及び Smad2/3 シグナル伝達活性化に関する評価に供した。赤血球の分化成熟度解析は骨髄塗抹標本の病理学的検討に加えて、骨髄の赤血球前駆細胞を蛍光標識抗 CD71 抗体及び抗 Ter119 抗体で染色することでも評価した。

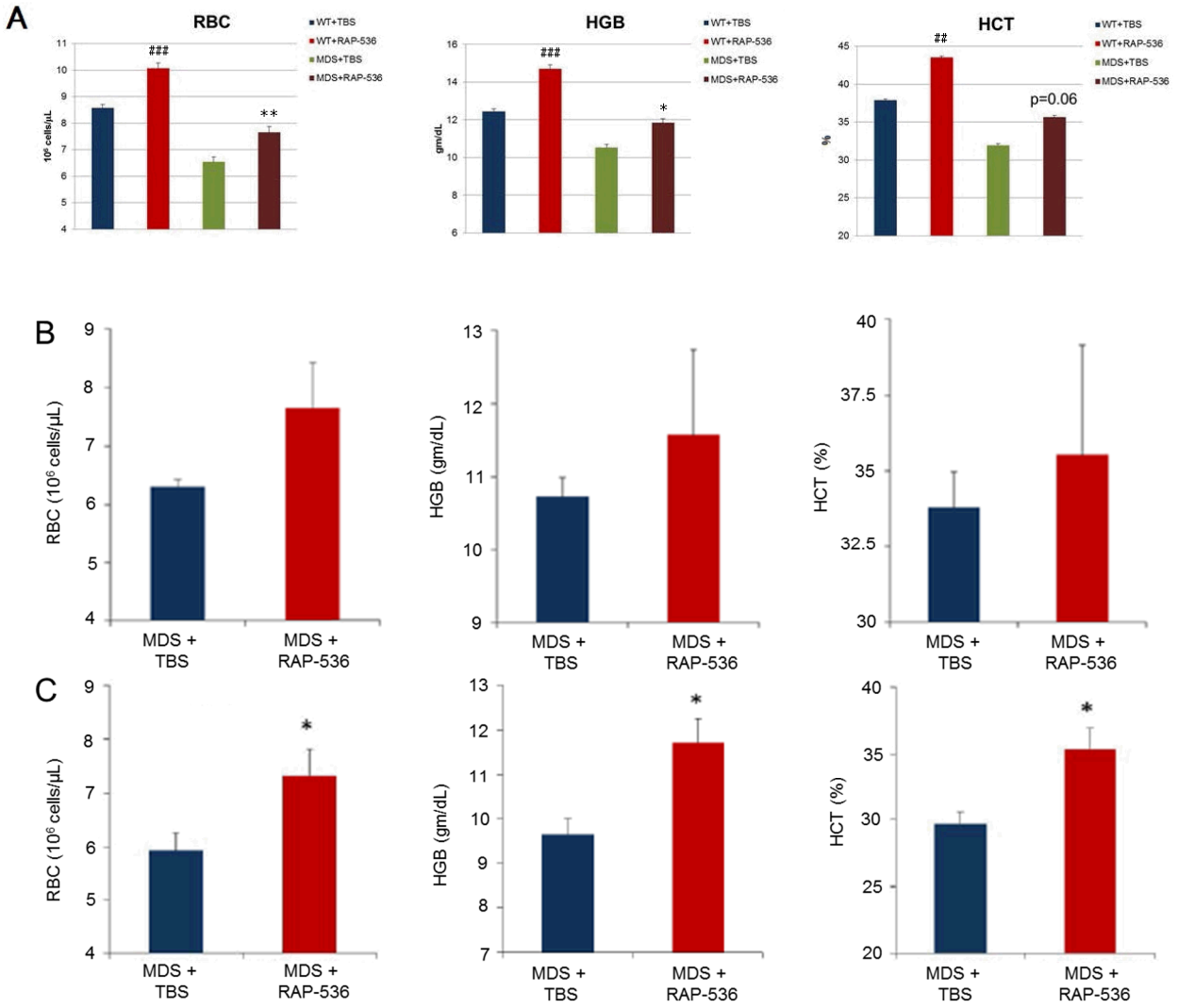
初期 MDS マウス（4 ヵ月齢）に溶媒を 8 週間投与すると（＝約 6 ヵ月齢に到達）、赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値）が正常マウスと比較してそれぞれ 23.6%、15.4%及び 15.7%減少していたが、同マウスに RAP-536 を 8 週間投与することでこれらの赤血球パラメータはそれぞれ 16.9%、12.5%及び 11.64%増加した（溶媒投与群との比較、Figure 2.2.2-3A）。骨髄細胞の赤血球分化成熟度解析では、溶媒を投与したマウスの赤血球前駆細胞の割合の増加が正常マウスとの比較において認められた［52.01%（Figure 2.2.2-4B 上段） vs. 26.07%（Figure 2.2.2-4A）］。一方、RAP-536 投与により赤血球前駆体の割合が 31.69%に低下し、赤血球過形成の低下が認められ



Approved v3.0

た（Figure 2.2.2-4B 上段）。同様に、フローサイトメトリー解析でも RAP-536 投与マウス由来骨髄検体の Ter119 陽性赤血球前駆細胞が減少する傾向が認められた（Figure 2.2.2-5A）。

**Figure 2.2.2-3:** **骨髄異形成症候群（初期、中期及び後期）のモデルマウスにおける赤血球パラメータに対する RAP-536 の作用**



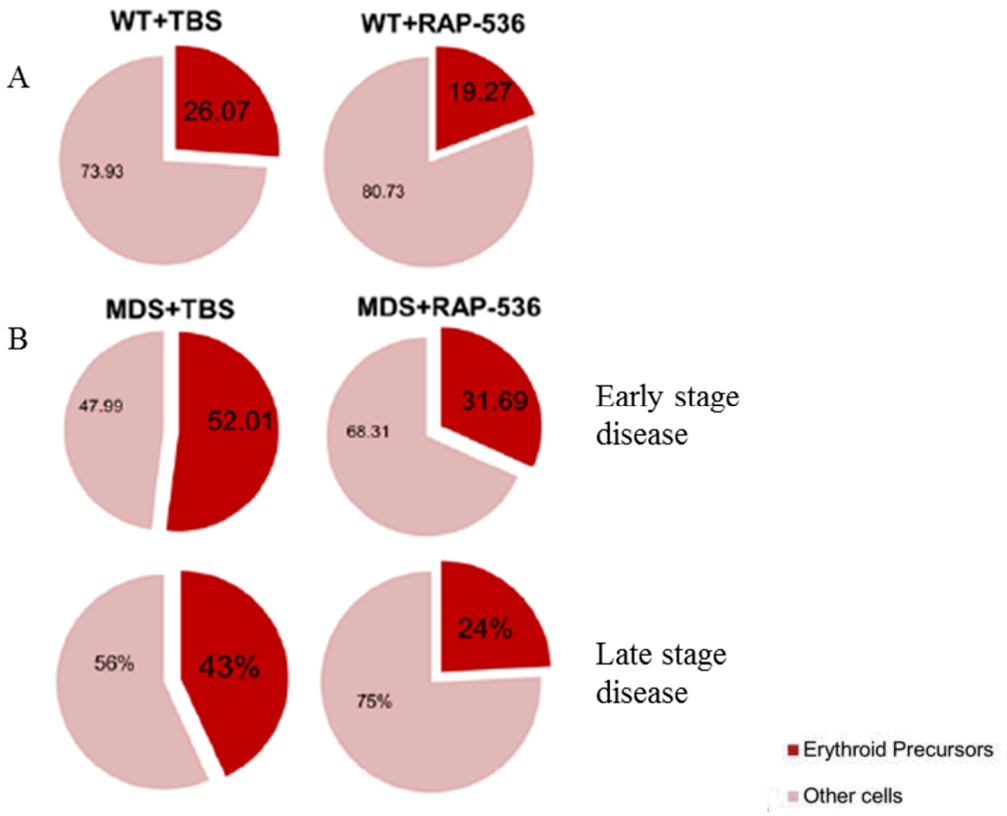

WT：（野生型）正常マウス、MDS：NHD13 マウス
初期（A）、中期（B）及び後期（C）の MDS 病態をそれぞれ示す約 4、8 及び 10 ヵ月齢に到達した雄 NHD13 マウス（n = 4～6）に、RAP-536（10 mg/kg）又は溶媒（TBS）を週 2 回皮下投与した。なお、月齢を一致させた雄正常 FVB マウス（n = 5～6）を初期 MDS 病態の対照群として含めた。8 週間（初期の場合）又は 6 週間（中期及び後期の場合）薬物投与を継続した後に図に示す赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）をそれぞれ測定した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
* P ≤ 0.05、** P ≤ 0.01 vs. MDS+TBS 群　　## P ≤ 0.01、### P ≤ 0.001 vs. WT+TBS 群
出典：M4.2.1.1-16 より改変



Approved v3.0

中期 MDS マウス（8 ヵ月齢）に RAP-536 又は溶媒を 6 週間投与すると（＝約 10 ヵ月齢に到達）、RAP-536 投与群では溶媒対照群と比較して赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値がそれぞれ 21.2%、7.8%及び 5.1%増加した［統計学的有意差なし、（Figure 2.2.2-3B）］。また、フローサイトメトリー解析の結果、RAP-536 投与群の骨髄検体では Ter119 陽性赤血球前駆細胞の減少傾向が認められたが（Figure 2.2.2-5B）、骨髄細胞の赤血球分化成熟度解析ではこの傾向は認められなかった（データ示さず）。

**Figure 2.2.2-4:** **骨髄異形成症候群（初期及び後期）モデルマウスの骨髄における赤血球過形成に対する RAP-536 の影響**




円グラフ中の数字はすべて百分率（%）を示す。
溶媒（TBS）又は RAP-536（10 mg/kg）を週 2 回皮下投与した雄正常マウス（A）及び雄 NHD13 マウス（B）の骨髄塗抹標本を赤血球前駆細胞及びその他の細胞に分けて計測した（n = 5～6）。
出典：M4.2.1.1-16 より改変

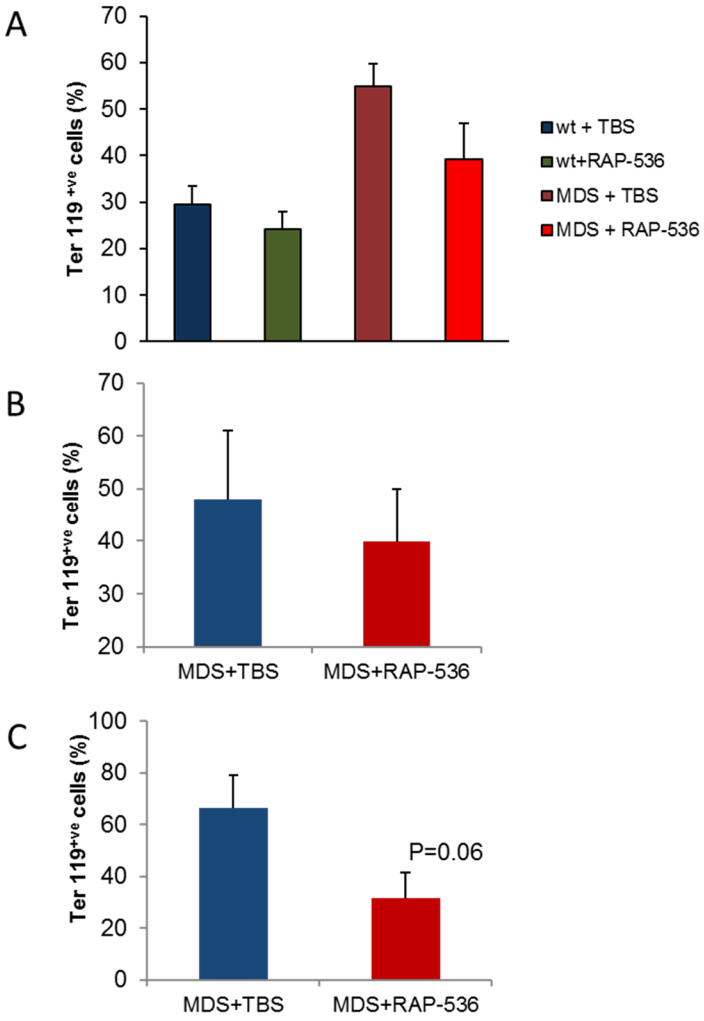
後期 MDS マウス（10 ヵ月齢）に RAP-536 を 6 週間投与すると（＝約 12 ヵ月齢に到達）、溶媒投与した同マウスと比較して赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値がそれぞれ 24%、21.4%及び 19%増加した（Figure 2.2.2-3C）。なお、溶媒投与群と比較して、RAP-536 投与群では骨髄の赤血球前駆細胞の割合が 43%から 24%に減少したことから（Figure 2.2.2-4B 下段）、赤血球過形成の減



Approved v3.0

少が示された。同様に、フローサイトメトリー解析でも RAP-536 投与群の骨髄検体では Ter119 陽性赤血球前駆細胞が減少する傾向が認められた（Figure 2.2.2-5C）。

**Figure 2.2.2-5:** **骨髄異形成症候群（初期、中期及び後期）のモデルマウスにおける骨髄赤血球前駆体に対する RAP-536 投与の影響**



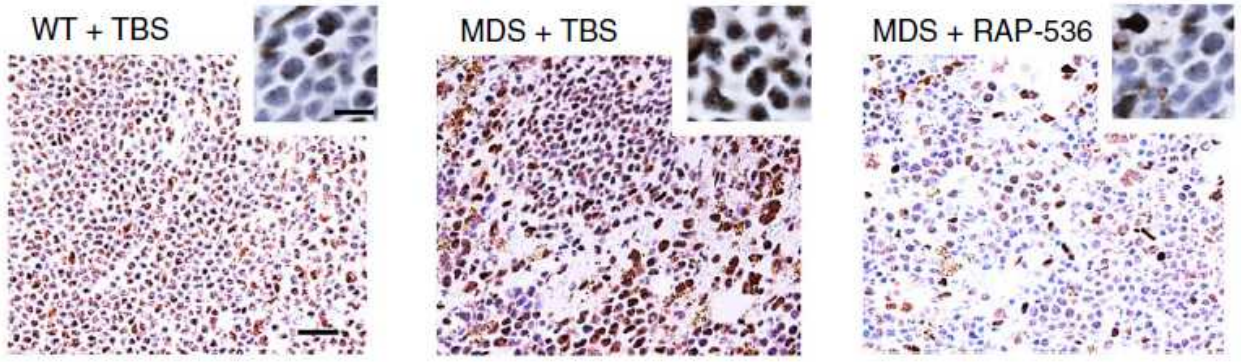

RAP-536（10 mg/kg）又は溶媒（TBS）を初期（A）、中期（B）及び後期（C）の MDS 病態をそれぞれ呈する約 4、8 又は 10 ヵ月齢の雄 NHD13 マウス（n = 4～6）に週 2 回皮下投与した。なお、月齢を一致させた雄正常マウス（n = 5～6）を初期 MDS 病態の対照群として含めた。蛍光標識した抗 CD71 抗体及び抗 Ter119 抗体を用いて骨髄赤血球前駆細胞フローサイトメトリー解析を実施し、赤血球の過形成及び分化成熟度を測定した。各データは平均値±標準誤差で示し、統計学的有意差検定には non-paired Student's t-test を用いた。
出典：M4.2.1.1-16 より改変



Approved v3.0

また、溶媒を投与した後期 MDS マウスから採取した脾臓組織検体では、正常マウスと比較してリン酸化 Smad2/3 免疫染色度の増加が認められたが、RAP-536 投与群ではこの増加が抑制されたことから（Figure 2.2.2-6）、RAP-536 は 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。

**Figure 2.2.2-6:** **後期骨髄異形成症候群モデルマウスの脾臓における Smad2/3 活性化に対する RAP-536 の作用**




（左から）溶媒（TBS）投与した正常マウス、溶媒を投与した後期 MDS マウス及び RAP-536（10 mg/kg）を投与した後期 MDS マウス（すべて雄）のヘマトキシリン対比染色脾臓組織切片を、リン酸化 Smad2/3 免疫染色（褐色）したときの代表例。スケールバーは 100 μm（下）及び 10 μm（上）を示す。
出典：M4.2.1.1-16

以上のように、RAP-536 は MDS モデルマウスにおいて、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値を増加させ、後期 MDS であっても Smad2/3 シグナル伝達活性化を阻害し赤血球過形成を抑制することが示された。

## 3 副次的薬理試験

Luspatercept を用いた副次的薬理試験は実施しなかった。なお、TGF-β スーパーファミリーリガンド群における結合特異性については 2.1.1 項にて評価した。

## 4 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［医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適合］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［試験番号 WHH00067（M4.2.3.2-3）及び試験番号 20017483（M4.2.3.2-4）］（【M2.6.6、3.2 項】参照）。これらの毒性試験では心血管系機



Approved v3.0

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を2週間に1回皮下投与又は10 mg/kgを2週間に1回静脈内投与）及び3ヵ月間反復投与試験（最高用量30 mg/kgを2週間に1回皮下投与）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投与後0時間から336時間までの血清中濃度時間曲線下面積（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（3週間に1回投与）での定常状態における推定AUC(0-21d)｛6468 µg•h/mL［1 mg/kgの用量で3週間に1回投与した時の幾何平均AUC(0-21d)：154 day•µg/mL（【M5.3.3.5.4 ACE-536-MPK-008 Table 5.1.5.2-1】参照）から換算］｝の20倍であった。

## 5 薬力学的薬物相互作用試験

EPO以外の薬物とluspatercept の薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

## 6 考察及び結論

非臨床試験において検討したすべての動物種でluspatercept/RAP-536は赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値を急速かつ持続的に増加させることが示された。例えば、正常マウスを用いた試験では0.3 mg/kgから10 mg/kgの用量範囲でluspatercept はこれらの赤血球パラメータを用量依存的かつ統計学的有意（溶媒対照群との比較、高用量群のみ）に増加させた。また、RAP-536投与により赤血球産生の後期段階にある赤血球前駆細胞が増加することや、赤血球パラメータがluspatercept投与後短時間で増加したことから明らかなように、luspatercept/RAP-536の赤血球系に対する影響は後期成熟期にある細胞に選択的に生じると考えられた。

リガンド結合能試験でluspatercept は特定のTGF-βスーパーファミリーリガンドすなわちGDF11、GDF8、BMP6、アクチビンBに対して高い結合親和性を示すこと、また、生細胞を用いたレポーターアッセイではGDF11、GDF8、（程度は低いものの）アクチビンBによるシグナル伝達活性化を阻害することが示された。さらに、以下の知見も確認されている[14]：

- マウス胎児肝臓由来の赤血球前駆細胞では、成熟した赤血球前駆細胞と比較して未成熟の同細胞でGDF11メッセンジャーリボ核酸（mRNA）及びActRIIB mRNAが高レベルに発現していた一方で、GDF8 mRNAはいずれの細胞でも検出されない。
- Ex vivoでの赤血球前駆細胞の同調分化において、GDF11 mRNAとActRIIB mRNAの量は未成熟の段階が最も高く、その後の48時間をかけて次第に低下する。



Approved v3.0

- 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。
- 抗アクチビン A 抗体による野生型マウスの前処置又はインヒビン C 若しくはインヒビン E を欠失するトランスジェニックマウスにおいても、RAP-536 に対する赤血球産生反応は変化せず、このことから当該反応がこれらのリガンドとは無関係に生じる。

Luspatercept が捕捉するリガンドのうち、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。すなわち、luspatercept は GDF11 と高親和性を以て結合し、またレポーター細胞アッセイでは GDF11 によって惹起される細胞内シグナル伝達活性化が luspatercept により阻害された。上記のとおり、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 は luspatercept が捕捉するリガンドの中で重要な一つであると考えられる。

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。RAP-536 は投与後 72 時間には骨髄及び脾臓の Baso E を減少させており、また、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。さらに、luspatercept/RAP-536 の短期作用が抗 EPO 抗体存在下でも認められたことは、EPO は早期赤芽球のみを刺激する[27]のに対し、luspatercept は後期赤血球前駆細胞を標的にするという考察を支持するものであった。興味深いことに、luspatercept の投与により血清 EPO 濃度が中等度かつ一過性に上昇するが、これはおそらく前赤血球集団を再増殖させるフィードバック機構が働いた結果であると考えられた。さらに、luspatercept と EPO を併用投与すると、それぞれの単独投与と比較して赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値が顕著に増加した。

MDS モデル動物を用いた試験では、luspatercept のヒトにおける治療効果を示唆する結果が得られた。すなわち、MDS モデルである NHD13 マウスに RAP-536 を投与すると、Smad2/3 リン酸化が抑制され、赤血球過形成が低下し、MDS の特徴である貧血状態が改善した。さらに、野生型マウスに GDF11 を慢性投与すると赤血球パラメータ低下及び軽度貧血が生じ、それに伴って脾臓重量と赤血球前駆体数が増加することが、また MDS 患者の血中 GDF11 濃度は正常人の同濃度と比べて高値であることが確認されている [14]。これらの結果から、luspatercept/RAP-536 が GDF11 の作用を阻害することで赤血球分化能を正常化し、それによって貧血症状が改善すると考えられる[28]。

以上のように、正常動物及び MDS モデルマウスにおいて luspatercept は各赤血球パラメータを増加させることが示され、また、安全性薬理作用にも懸念となるものはなかった。その作用機序に鑑み、本薬が MDS に伴う貧血に対する新規作用機序を有する治療薬になることが期待される。



Approved v3.0

# 7 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] Aykul S, Martinez-Hackert E. Transforming growth factor-β family ligands can function as antagonists by competing for Type II receptor binding. J Biol Chem 2016;291:10792-804.

[9] 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.

[10] Goebel EJ, Kattamuri C, Gipson GR, et al. Structures of activin ligand traps using natural sets of type I and type II TGFβ receptors. iScience 2021;25:103590.

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

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

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

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

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

[19] Bloise E, Ciarmela P, Dela Cruz C, et al. ACTIVIN A IN MAMMALIAN PHYSIOLOGY. Physiol Rev 2019;99:739-80.

[20] Korchynskyi O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. J Biol Chem 2002;277:4883-91.

[21] RAP-536: DOSE RESPONSE IN MICE (Study PPR082). Acceleron Pharma Inc.; 2015.

[22] ACE-036: A Forty-four Day Pharmacology Study for ACE-036 Administered Subcutaneously in the Cynomolgus Monkey (Study 023701). Acceleron Pharma Inc.; 2009.

[23] Lundby C, Thomsen JJ, Boushel R, et al. Erythropoietin treatment elevates haemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume. J Physiol 2007;578:309-14.

[24] ACE-536: THE EFFECT OF ACE-536 ON ERYTHROID PROGENITOR PROLIFERATION (Study PPR066). Acceleron Pharma Inc.; 2010.

[25] Millot S, Andrieu V, Letteron P, et al. Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. Blood 2010;116:6072-81.

[26] 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.

[27] 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.

[28] Paulson RF. Targeting a new regulator of erythropoiesis to alleviate anemia. Nat Med 2014;20:334-5.

**Table of Contents**

1 薬理試験：一覧表 ..... 2
2 効力を裏付ける試験 ..... 5
3 副次的薬理試験 ..... 19
4 安全性薬理試験 ..... 19
5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 19



Approved v2.0

# 1 薬理試験：一覧表

**Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | Location in Dossier |
|---|---|---|---|---|---|
| **Primary Pharmacodynamics** | | | | | |
| Ligand Binding and Specificity of Luspatercept | Biacore (luspatercept captured by immobilized goat anti-human Fc antibody) | In vitro | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR089 | M4.2.1.1-1 |
| In Silico Sequence Alignment Across Multiple Species; and Surface Plasmon Resonance Analysis of Luspatercept and Murine Ortholog of Luspatercept (RAP-536) for Transforming Growth Factor beta (TGF-β) Ligands | In silico; and Biacore (luspatercept or RAP-536 captured by immobilized goat anti-human Fc antibody) | In silico, in vitro | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR125 | M4.2.1.1-2 |
| Inhibition of Ligand-induced Reporter Gene Expression by Luspatercept | pGL3 luciferase reporter gene under the control of different promotor motifs transfected into different cell lines (A204, HepG2, T98G), depending on the TGF-β superfamily ligands | In vitro | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR122 | M4.2.1.1-3 |
| Luspatercept: Dose Response in Mice | C57BL/6 mice | In vivo, subcutaneous (SC) | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR062 | M4.2.1.1-4 |
| Luspatercept: Effects on Acute erythropoietin (EPO) Expression in Mice | C57BL/6 mice | In vivo, intraperitoneal (IP) | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR065 | M4.2.1.1-5 |
| RAP-536: Analysis of Red Blood Cell (RBC) Half-Life | C57BL/6 mice | In vivo, SC | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR074 | M4.2.1.1-6 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | Location in Dossier |
|---|---|---|---|---|---|
| Comparative Analysis of RAP-536 and EPO Administration on Rat Plasma Volume | Sprague Dawley rats | In vivo, SC | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR080 | M4.2.1.1-7 |
| Effect of RAP-536 on Terminal Erythroid Differentiation | C57BL/6 mice | In vivo, SC | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | Suragani, 2014 | M4.2.1.1-8 |
| Testing In Vivo Effects of Test Compounds Using In Vitro Analysis of Production of Colony Forming Cells (CFCs) and Examination of Erythroid Progenitor Frequency from Mouse Bone Marrow and Spleen | BDF1 mice | In vivo, SC | [redacted] Canada | ACL04 | M4.2.1.1-9 |
| Duration of Increased EPO Expression After One Week of Luspatercept Dosing | C57BL/6N mice | In vivo, SC | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR084 | M4.2.1.1-10 |
| Effects of Luspatercept on Long Term EPO Expression | C57BL/6N mice | In vivo, SC | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR083 | M4.2.1.1-11 |
| Combined Effect of Luspatercept and Recombinant EPO on RBC Maturation | C57BL/6 mice | In vivo, IP | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR087 | M4.2.1.1-12 |
| Effect of Luspatercept in Context of EPO Inhibition | C57BL/6 mice | In vivo, IP | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR063 | M4.2.1.1-13 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Test System | Method of Administration | Testing Facility | Study Number | Location in Dossier |
|---|---|---|---|---|---|
| Effect of RAP-536 on Terminal Erythroid Differentiation and RBC Formation Following EPO Inhibition | C57BL/6N mice | In vivo, SC (RAP-536) and IP [EPO monoclonal antibody (mAb)] | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR088 | M4.2.1.1-14 |
| RAP-536 Prevents Anemia in Murine Model of Myelodysplastic Syndrome (MDS) | Transgenic mouse model expressing NUP98-HOXD13 fusion gene (NHD13 mice) | In vivo, SC | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR085 | M4.2.1.1-15 |
| RAP-536 Prevents Anemia in Murine Model of MDS | NHD13 mice | In vivo, SC | Acceleron Pharma, Cambridge, MA | PPR115 | M4.2.1.1-16 |

Abbreviations: CFCs = colony forming cells; EPO = erythropoietin; IP = intraperitoneal; mAb = monoclonal antibody; MDS = myelodysplastic syndrome; NHD13 mice = transgenic mouse model expressing NUP98-HOXD13 fusion gene; RAP-536 = murine ortholog of luspatercept; RBC = red blood cell; SC = subcutaneous; TGF-β = transforming growth factor beta.



Approved v2.0

## 2 効力を裏付ける試験

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Determination of Ligand Specificity and Affinity by Surface Plasmon Resonance | In vitro (Cell Free) | Not applicable (NA) | In vitro | Ligand screening: TGF-β superfamily members injected at 100 nM (or 200 nM) over captured luspatercept.<br><br>Kinetic analysis: range of concentrations injected over experimental and control flow cells (flow rate of ≥ 40 µL/min) to minimize mass transport limitations. Receptor-ligand association was followed for 300 sec and complex dissociation was followed for 600 sec. | Human bone morphogenetic protein (BMP)6, human Activin B and human growth and differentiation factor (GDF)11 bound with the highest affinities to luspatercept at 37°C. | PPR089 |

| Ligand | Binding Strength in Ligand Screening at 20°C[a] | Ligand Binding Affinity [Dissociation Constant ($K_D$) (nM)] at 37°C |
|---|---|---|
| human (h) BMP6 | ++++ | 0.18 |
| hActivin B | ++ | 0.27 |
| hGDF11 | ++++ | 0.71 |
| hGDF8 | ++++ | 3.00 |
| hBMP10 | ++++ | 1.28[b] |
| hActivin A | + | 12.7[b] |
| hBMP9 | +++ | 17.8[b] |
| hBMP7 | + | 138[b] |
| hGDF3 | + | NA |
| hBMP2 | No binding at 200 nM | No binding at 200 nM |
| hActivin AC | + | Not tested |
| hBMP4 | No binding at 200 nM | Not tested |

[a] Injected at 100 nM except where specified. Strength of binding is indicated by number of +.

[b] Complexes are characterized by very fast dissociation rates and are therefore considered transient.



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

<table>
<tr><th>Type of Study</th><th>Species/Strain</th><th>Sex and Number per Group</th><th>Method of Admin.</th><th>Dose/ Duration</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>In Silico Sequence Alignment of Activin Receptor Type IIB (ActRIIB) Extracellular Domain from Multiple Species</td><td>NA</td><td>NA</td><td>In silico, in vitro</td><td>NA</td><td>In silico: bovine, cynomolgus monkey, rat, mouse, and rabbit ActRIIB extracellular domain sequences have > 99% homology compared to the human ActRIIB extracellular domain.</td><td>PPR125</td></tr>
<tr><td>Determina-tion of Ligand Specificity and Affinity by Surface Plasmon Resonance</td><td>In vitro (Cell Free)</td><td>NA</td><td>In vitro</td><td>TGF-β superfamily members injected at 10 and 100 nM over captured luspatercept or RAP-536. Receptor-ligand association was followed for 300 sec and complex dissociation was followed for 600 sec.</td><td>In vitro: GDF11, GDF8, BMP6, Activin B, and BMP10 bound with the highest affinities to luspatercept/RAP-536.
<table>
<tr><th rowspan="2">Ligand</th><th colspan="2">Ligand Binding Affinity ($K_D$)</th></tr>
<tr><th>Luspatercept</th><th>RAP-536</th></tr>
<tr><td>hBMP6</td><td>4.398E-10 [a]</td><td>4.551E-10</td></tr>
<tr><td>hActivin B</td><td>1.634E-10</td><td>1.024E-10</td></tr>
<tr><td>hGDF11 (BMP11)</td><td>4.792E-11</td><td>3.032E-11</td></tr>
<tr><td>hGDF8</td><td>3.555E-10</td><td>1.335E-10</td></tr>
<tr><td>hBMP10</td><td>3.369E-10</td><td>1.319E-10</td></tr>
<tr><td>hActivin A</td><td>6.200E-9</td><td>2.243E-9</td></tr>
<tr><td>hBMP9 (GDF2)</td><td>1.727E-9</td><td>6.614E-10</td></tr>
<tr><td>hBMP7</td><td>1.526E-9 [a]</td><td>1.001E-9 [a]</td></tr>
<tr><td>hGDF3</td><td>9.222E-9</td><td>7.437E-9</td></tr>
<tr><td>hActivin AB</td><td>8.262E-9</td><td>8.212E-9</td></tr>
</table></td><td></td></tr>
</table>



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|

(continued)

| Ligand | Ligand Binding Affinity ($K_D$) | |
|---|---|---|
| | Luspatercept | RAP-536 |
| hActivin AC | 2.997E-8 | 3.573E-8 |
| hBMP5 | 2.363E-9 [a] | 1.877E-9 [a] |
| hBMP8b | 2.945E-8 | 2.462E-8 |
| hBMP4/7 | 2.989E-8 [a] | 4.770E-8 [a] |
| hBMP2/6 | 8.853E-10 [a] | 3.552E-10 [a] |
| hGDF1 | 1.922E-8 | 1.760E-8 |
| murine (m) GDF5 | 9.309E-9 | 8.339E-9 |
| hInhibin A | 4.295E-8 | Minimal Binding |

[a] Some non-specific binding was observed in the control flow cell that could contribute to the signal observed in the experimental flow cell.



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

<table>
<tr><th>Type of Study</th><th>Species/Strain</th><th>Sex and Number per Group</th><th>Method of Admin.</th><th>Dose/ Duration</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study Number</th></tr>
<tr><td>Inhibition of Cell Signal Transduc-tion</td><td>In vitro;<br>A204 (ATCC HTB-82) human rhabdo-myosarcoma cell line transfected with a pGL3(CAGA)12 reporter plasmid<br><br>T98G human glioblastoma cell line transfected with a pGL3 bone morphogenetic protein responsive element (BRE) reporter plasmid<br><br>HepG2 (ATCC HB-8065) human hepatocellular carcinoma cell line transfected with a pGL3 BRE reporter plasmid</td><td>NA</td><td>In vitro</td><td>Luspatercept serial dilutions<br>GDF8, GDF11, activin A, activin B: 5 ng/mL, 6 hours (hr) incubation<br>BMP9: 600 pg/mL, 18-20 hr incubation<br>BMP10: 350 pg/mL, 18-20 hr incubation<br>BMP6: 4.4 ng/mL, 18-20 hr incubation</td><td>Luspatercept inhibited only GDF8 and GDF11 in a cell-based reporter gene assay.
<table>
<tr><th>Effec-tor</th><th>Promotor Element</th><th>Cell Line</th><th>Ligand</th><th>Inhibition of Signaling [50% Inhibitory Concentra-tion (ng/mL)]</th></tr>
<tr><td rowspan="4">Smad 2, 3</td><td rowspan="4">CAGA12</td><td rowspan="4">A204</td><td>GDF11</td><td>7.1</td></tr>
<tr><td>GDF8</td><td>88</td></tr>
<tr><td>Activin B</td><td>14400</td></tr>
<tr><td>Activin A</td><td>~ 33300</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Smad 1, 5, 8</td><td rowspan="3">BRE</td><td rowspan="2">T98G</td><td>BMP9</td><td>> 3333</td></tr>
<tr><td>BMP10</td><td>> 10000[a]</td></tr>
<tr><td>HepG2</td><td>BMP6</td><td>> 10000[a]</td></tr>
</table>
[a] Highest concentration tested.</td><td>PPR122</td></tr>
</table>



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Luspatercept Dose Response Effect on Red Cell Parameters | C57BL/6 mice | 8 to 9 male (M)/group | SC | 0 [phosphate-buffered saline (PBS)], 0.1, 0.3, 1, 3, or 10 mg/kg luspatercept<br>twice weekly for 8 weeks | No effect on body weight, spleen, or liver weights.<br>Increased (↑) RBC, hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT) with dose, statistically significant at 3 and 10 mg/kg [P<0.001 versus (vs.) vehicle group].<br>No changes in trabecular bone growth as determined by bone volume fraction and trabecular number, thickness and spacing (assessed by micro-computed tomography). | PPR062 |
| Effects on Acute EPO Expression | C57BL/6 mice | 7 to 8 M/group | IP | 10 mg/kg luspatercept<br>single dose administered either 12, 24, 48, or 72 hr prior to termination | ↑ RBC, HGB, HCT at all time points (P≤0.01).<br>Decreased (↓) EPO transcript levels in kidney [only significant (P≤0.05) at 12 hr time point] and EPO serum protein levels [significant (P≤0.05) at all but the 48 hr time point].<br>↑ RBC is associated with ↓ EPO expression, showing that the acute phase of luspatercept-induced erythropoiesis occurs in an EPO-independent manner. | PPR065 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RAP-536: Analysis of RBC Half-Life | C57BL/6 mice | 3 to 5 M/group | SC | RAP-536: 10 mg/kg twice weekly<br>EPO: 1500 U/kg thrice weekly<br>Tris-buffered saline (TBS): thrice weekly<br><br>2 arms, RBC were biotinylated in vivo prior to treatment, or mice were treated for 45 days prior to biotinylation. | **Treatment after biotinylation (AP529b):**<br>In this 5-week study, RAP-536 treatment ↑ RBC (+19%), HGB (+13%), HCT (+12%) (P<0.01) and EPO treatment ↑ RBC (+51%), HGB (+53%), HCT (+50%) (P<0.001).<br>RBC half-life (calculated from regression plotted by decline in biotinylated RBCs over time): 21.8 (TBS), 21.8 (RAP-536), 17.4 (EPO) days. Significant difference in EPO vs. TBS and RAP-536 (P<0.01) but not RAP-536 vs. TBS.<br><br>**Treatment carried out before and either continued or terminated after biotinylation (AP558b):**<br>In this 12-week study, RAP-536 ↑ RBC (+20%), HGB (+16%), HCT (+12%) (not significant) and EPO treatment ↑ RBC (+73%), HGB (+86%), HCT (+86%) (P<0.001).<br>RAP-536 treatment during pre-labeling period only resulted in 21% to 25% increase in RBC parameters (not significant). EPO-induced increase was greater than TBS and RAP-536 (P<0.001) during either continued or pre-labeling only.<br>RBC half-life: 25.3 (TBS), 26.4 (RAP-536), 23.6 (EPO) and 28.2 (RAP-536 pre-label) days. Significant decrease in EPO-treated and a significant increase in RAP-536-treated pre-label vs. TBS controls (P<0.05). | PPR074 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | In conclusion, RAP-536 and EPO induce ↑ RBC, HGB, and HCT when administered pre- or post-RBC labeling but RAP-536 increase was not statistically significant in pre-treatment arm. No significant RAP-536-induced change in in vivo circulating RBC half-life labeled prior to RAP-536 dosing; however, when treated with RAP-536 only for 45 days prior to RBC labeling, RBC half-life was significantly increased. EPO treatment resulted in ↓ RBC half-life in both arms. | |
| Effect of RAP-536 on Plasma Volume Compared to EPO | Sprague Dawley rats | 5 to 6 M/group | SC | 0 (TBS)<br>10 mg/kg RAP-536 on Days 0 and 4<br>1000 U/kg EPO on Days 0, 2, 4 | On Day 7, RAP-536 induced 26% ↓ ($P \leq 0.01$) in plasma volume vs. 13% ($P \leq 0.05$) induced by EPO as assessed by cardiogreen dye clearance over 10 min. | PPR080 |
| Effect of RAP-536 on Terminal Erythroid Differenti-ation | C57BL/6 mice | 5 M/group | SC | 10 mg/kg RAP-536 | Differentiation profiling of terminal erythroid precursors from bone marrow and spleen at 72 hr after treatment with vehicle (TBS) or RAP-536 using fluorescently labeled anti-CD71 and anti-Ter119 antibodies by flow cytometry: RAP-536 ↓ basophilic erythroblasts, concurrent ↑ in late stage polychromatic and orthochromatic erythroblasts and reticulocytes vs. vehicle-treated group, demonstrating that RAP-536 promotes maturation of late stage erythroid precursors. | Suragani, 2014 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| In vivo Effects of Test Compounds Using In Vitro Analysis of Production of CFCs and Examination of Erythroid Progenitor Frequency from Mouse Bone Marrow and Spleen | BDF1 mice | 8 female (F)/group | SC | RAP-536: 0 (TBS) or 10 mg/kg on Days 1 and 3<br>Termination on Day 9<br>Bone marrow and spleen cells were prepared and cultured in methylcellulose-based media. | RAP-536: No differences in nucleated cell number in femur or spleen before and after RBC lysis. In femurs, significant ↓ mature erythroid progenitor [colony forming units erythroid (CFU-E)] colony number per dish, frequency, and total CFU-E per femur. Significant ↓ colony forming units, granulocyte-macrophage and CFC colony number per dish and frequency. In spleen, significant ↑ CFU-E colony number per dish, frequency, and total CFU-E per spleen. Significant ↑ burst forming units-erythroid colony number per dish and in frequency.<br>Morphology of femur and spleen-derived myeloid, erythroid and multipotential hematopoietic colonies from all treated animals was normal.<br>All findings as compared to TBS control. | ACL04 |
| Duration of Increased EPO Expression after 1 Week of Luspatercept Treatment | C57BL/6N mice | 5 M/group | SC | 0 (TBS) or 10 mg/kg luspatercept twice weekly for 1 week (2 doses)<br>Termination 14 or 30 days after the final dose | 14 days: luspatercept significant ↑ RBC vs. TBS ($P<0.01$). ↑serum EPO levels (88.9 pg/mL vs. 41.9 pg/mL in TBS group, $P<0.01$).<br>30 days: luspatercept significant ↑ RBC vs. TBS ($P<0.05$). No change in serum EPO levels (21.94 pg/mL vs. 20.98 pg/mL in TBS group).<br>Luspatercept treatment for 1 week ↑ RBC parameters lasting up to 30 days, with transient ↑in serum EPO levels that completely reverses by 30 days post-treatment. | PPR084 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of Luspatercept on Long Term EPO Expression | C57BL/6N mice | 5 M/group | SC | 0 (TBS) or 10 mg/kg luspatercept twice weekly for 3, 7, or 28 days, or 1 mg/kg luspatercept twice weekly for 28 days | **10 mg/kg:**<br>3-day treatment - ↑ RBC (+14.5%), HGB (+14.8%), HCT (+13.5%) vs. TBS. Non-significant ↓ serum EPO levels (23.9 pg/mL vs. 46.0 pg/mL in TBS group).<br>7-day treatment - ↑ RBC (+11.19%), HGB (+7.57%), HCT (+6.23%) vs. TBS. ↑ serum EPO levels (50.7 pg/mL vs. 32 pg/mL in TBS group).<br>28-day treatment - ↑ RBC (+26.2%), HGB (+20.6%), HCT (+16.4%) vs. TBS. ↑serum EPO levels (153.3 pg/mL vs. 94.6 pg/mL in TBS group).<br>**1 mg/kg:**<br>↑ RBC (+14.02%), HGB (+8.58%), HCT (+9.6%) vs. TBS. ↑serum EPO levels (99.2 pg/mL vs. 94.6 pg/mL in TBS group).<br>Luspatercept ↑ RBC parameters independent of EPO for the first 3 days consistent with previous data showing luspatercept acts on the later stages of erythroid differentiation. However, luspatercept (10 mg/kg) treatment for 28 days ↑ RBC and serum EPO levels, suggesting that continued supply of erythroid progenitors is required by EPO for sustained luspatercept effects on RBC. | PPR083 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Combined Effect of Luspatercept and EPO on RBC Maturation | C57BL/6 mice | 4 M/group | IP | Luspatercept: 10 mg/kg<br><br>EPO: 1800 U/kg<br><br>Single doses alone or in combination, or TBS vehicle control<br><br>Termination 72 hr post-treatment | Luspatercept - ↑ RBC (+8.4%), HGB (+8.0%), HCT (+6.96%).<br>EPO - ↑ RBC (+5.6%), HGB (+8.5%), HCT (+9.2%).<br>Luspatercept + EPO - ↑ RBC (+20.3%), HGB (+23.1%), HCT (+22.5 %) (P<0.001).<br>Terminal erythroid differentiation profiling (using Ter119+ and CD71 fluorescent antibodies) of splenic erythroblasts showed luspatercept promotes maturation of late stage erythroid differentiation. Luspatercept + EPO further enhanced maturation of basophilic erythroblasts to late ortho and reticulocytes vs. EPO alone, further establishing the effect of luspatercept on maturation of erythroid precursors. | PPR087 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of Luspatercept in Context of EPO Inhibition | C57BL/6 mice | 5 M/group | IP | Luspatercept: 10 mg/kg<br><br>Anti-EPO mAb: 5.5 mg/kg<br><br>2 arms, mice administered either 1 cycle of treatment and were terminated on Day 4, or 2 cycles of treatment and were terminated on Day 7 | **4-day (1 cycle) study arm:**<br>Luspatercept - ↑ RBC (+9%), HGB (+8%), HCT (+6%) vs. vehicle (TBS) (P≤0.01).<br>No effect on EPO transcript levels in kidney or EPO protein in serum vs. TBS.<br>Anti-EPO mAb - ↓ RBC (-11%), HGB (-14%), HCT (-11%) vs. TBS (P≤0.001).<br>↑ EPO transcript levels in kidney (3.3-fold vs. TBS, P≤0. 01) and EPO protein in serum (15.7-fold vs. TBS, P≤0.001).<br>Luspatercept + anti-EPO mAb - ↑ RBC vs. TBS (P≤0.05), HGB and HCT equivalent to TBS.<br>↑ EPO transcript in kidney (2-fold vs. TBS, P≤0.05) and EPO serum protein levels (13.4-fold vs. TBS, P≤0.001) but to a lower extent (-14%) than anti-EPO mAb alone.<br>**7-day (2 cycles) study arm:**<br>Luspatercept - ↑ RBC, HGB, HCT vs. TBS (P≤0.01)<br>↑ EPO transcript levels in kidney (4.3-fold vs. TBS, P≤0.05) and EPO protein in serum (2.5-fold vs. TBS, P≤0.01).<br>Anti-EPO mAb - ↓ RBC, HGB, HCT vs. TBS (P≤0.05).<br>↑ EPO transcript levels in kidney (4.4-fold vs. TBS, P≤0.001) and EPO protein in serum (39.3-fold vs. TBS, P≤0.001).<br>Luspatercept + anti-EPO mAb - RBC and HCT similar to TBS, ↓ HGB vs. TBS (P≤0.01).<br>↑ EPO transcript in kidney (10-fold vs. TBS, P≤0.01) and EPO serum protein levels (46.4-fold vs. TBS, P≤0.001). | PPR063 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | No change in kidney or spleen weights in any treatment group.<br>Short-term effect of luspatercept on RBC is not EPO-dependent, but EPO may be necessary to sustain increase in RBC production. Consistent with this, co-administration of luspatercept and EPO mAb significantly decreased EPO expression at Day 4 and increased EPO expression at Day 7, compared to EPO mAb alone. | |
| Effect of RAP-536 on Terminal Erythroid Differentia-tion and RBC Formation following EPO Inhibition | C57BL/6N mice | 5 M/group | RAP-536: SC<br>EPO mAb: IP | RAP-536: 0 (TBS), 10 mg/kg<br>anti-EPO mAb: 0 (PBS), 120 µg/mouse<br><br>**4-day arm:**<br>RAP-536 Day 0<br>anti-EPO mAb Days -4, 2, 0, 2<br>Termination on Day 4<br>**9-day arm:**<br>RAP-536 Days 0, 2, 7<br>anti-EPO mAb Days -4, -2, 0, 2, 4, 6, 8<br>Termination on Day 9 | **4-day arm:**<br>RAP-536 alone: ↑ RBC (+7.5%), HGB (+6.03%), HCT (+4.49%) vs. vehicle-treated mice.<br>Anti-EPO mAb alone: ↓ RBC (-23.71%), HGB (-23.81%), HCT (-25.71%) vs. vehicle-treated mice.<br>Anti-EPO mAb + RAP-536: ↑ RBC (+17.66%), HGB (+16.99%), HCT (+14.59%) vs. EPO mAb only, suggesting that at this timepoint, RAP-536-induced ↑ in RBC is EPO-independent.<br>**9-day arm:**<br>RAP-536 alone: ↑ RBC (+13.1%), HGB (+12.3%), HCT (+9.26%) vs. vehicle-treated mice.<br>Anti-EPO mAb alone: ↓ RBC (-16.12%), HGB (-16.69%), HCT (-18.2%) vs. vehicle-treated mice.<br>Anti-EPO mAb + RAP-536: ↑ RBC (+7.74%), HGB (+3.8%) and HCT (+3.2%) vs. anti-EPO mAb alone, suggesting a requirement of EPO for continuous RAP-536-mediated RBC induction. | PPR088 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RAP-536 Prevents Anemia in Murine Model of MDS | Wild type (WT) or NHD13 mice | 7 to 8 M or 6 to 8 F/group | SC | 0 (TBS), or 10 mg/kg RAP-536 twice weekly for up to 12 months | NHD13 mice at 4 months of age - ↓ RBC, HCT vs. WT in M (P<0.05), more modest in F (not significant), ↓ leukocyte count.<br>**1 month of RAP-536 treatment** - in M, ↑ RBC (+9.2%), HGB (+13.1%), HCT (+10.8%) vs. TBS (P<0.01); in F, ↑ RBC (+3.0%), HCT (+4.9%) vs. TBS (P<0.05).<br>**4 months of RAP-536 treatment** - in M, ↑ RBC (+25.4%), HGB (+22.8%), HCT (+21.9%) vs. TBS (P<0.01); in F, ↑ RBC (+16.2%), HGB (+16.9%), HCT (+18.4%) vs. TBS (P<0.05).<br>**7 months of RAP-536 treatment** - in M, ↑ RBC (+13.8%, P=0.09), HGB (+19.8%, P<0.05), HCT (+14.8%, P=0.05) vs. TBS; in F, ↑ RBC (+27.2%), HGB (+21.5%), HCT (+22.9%) vs. TBS (P<0.001).<br>M treated with RAP-536: trend towards improved survival, overall survival between M and F was comparable to control groups. No difference in progression to leukemia related to treatment. | PPR085 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RAP-536 Prevents Anemia in Murine Model of MDS | WT or NHD13 mice [4, 8, or 10 months of age (early-, mid-, and late-stage MDS models, respectively)] | 4 to 6 M/group | SC | 0 (TBS), or 10 mg/kg RAP-536 twice weekly for 8 weeks (early-stage disease) or 6 weeks (mid- and late-stage disease) | **Early Stage:** At study termination (~6 months of age), MDS mice had ↓ RBC (-23.6%), HGB (-15.4%), HCT (-15.7%) vs. WT mice. ↑ erythroid precursors in MDS mice vs. WT mice (52.01% vs. 26.07%).<br>After 8 weeks treatment, RAP-536 ↑ RBC (+16.9%) (P<0.01), HGB (+12.5%) (P<0.05), HCT (+11.64%) (P=0.06) vs. TBS-treated MDS mice. RAP-536 ↓ bone marrow erythroid precursors to 31.69% indicating reduced erythroid hyperplasia.<br>**Mid Stage:** After 6 weeks treatment (mice ~ 10 months of age), RAP-536 ↑ RBC (+21.2%), HGB (+7.8%), HCT (+5.1%) vs. TBS-treated MDS mice (not statistically significant).<br>**Late Stage:** After 6 weeks treatment (mice ~12 months of age), RAP-536 ↑ RBC (+24%), HGB (+21.4%), HCT (+19%) vs. TBS-treated MDS mice (P<0.05). RAP-536 ↓ bone marrow erythroid precursors from 43% to 24% indicating reduced erythroid hyperplasia. Increased phosphorylated Smad2/3 immunostaining was displayed in spleens from MDS mice compared to WT mice, and RAP-536 treatment reduced this increase. | PPR115 |



Approved v2.0

**Table 2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics**

**Test article: Luspatercept**

| Type of Study | Species/Strain | Sex and Number per Group | Method of Admin. | Dose/ Duration | Noteworthy Findings | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | It is suggested that the use of a modified murine soluble ActRIIB receptor acts to reduce erythroid hyperplasia (observed in early and late stages) and increased RBC mass in MDS mice irrespective of disease severity. | |

Abbreviations: ActRIIB = activin receptor type IIB; BMP = bone morphogenetic protein; BRE = bone morphogenetic protein responsive element; CFC(s) = colony forming cell(s); CFU-E = colony forming units erythroid; EPO = erythropoietin; F = female; GDF = growth and differentiation factor; h = human; HCT = hematocrit; HGB = hemoglobin; hr = hours; IP = intraperitoneal; $K_D$ = dissociation constant; M = male; m = murine; mAb = monoclonal antibody; MDS = myelodysplastic syndrome; NA = not applicable; NHD13 mice = transgenic mouse model expressing NUP98-HOXD13 fusion gene; PBS = phosphate-buffered saline; RAP-536 = murine ortholog of luspatercept; RBC = red blood cell; SC = subcutaneous; TBS = Tris-buffered saline; TGF-β = transforming growth factor beta; vs. = versus; WT = wild type; ↓ = decreased; ↑ = increased.

## 3 副次的薬理試験

該当なし

## 4 安全性薬理試験

該当なし

## 5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし



Approved v2.0