Table of Contents

1 まとめ 5
2 単回投与毒性試験 8
3 反復投与毒性試験 8
3.1 ラットを用いた試験 8
3.1.1 ラット 1 ヵ月間反復投与毒性及び 2 ヵ月間回復性試験 8
3.1.2 成熟及び若齢成熟ラット 3 ヵ月間反復投与毒性及び 10 週間回復性試験 10
3.2 サルを用いた試験 12
3.2.1 サル 1 ヵ月間反復皮下又は静脈内投与毒性及び 10 週間回復性試験 12
3.2.2 サル 3 ヵ月間反復投与毒性及び 10 週間回復性試験 14
3.2.3 サル 6 ヵ月間反復投与毒性及び 3 ヵ月間回復性試験 15
4 遺伝毒性試験 17
5 がん原性試験 17
6 生殖発生毒性試験 17
6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 18
6.1.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 18
6.1.2 雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 18
6.2 胚・胎児発生に関する試験 19
6.2.1 ラット胚・胎児発生用量設定試験 19
6.2.2 ラット胚・胎児発生に関する試験 20
6.2.3 ウサギ胚・胎児発生用量設定試験 22
6.2.4 ウサギ胚・胎児発生に関する試験 23
6.3 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 25
6.3.1 ラット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 25
6.4 新生児を用いた試験 26
6.4.1 幼若ラット用量設定試験 26
6.4.2 幼若ラット毒性試験 28
7 局所刺激性試験 30
8 その他の毒性試験 30
8.1 ラット腎障害モデルを用いた腎毒性試験 30
9 考察及び結論 32
10 参考文献 39

Approved v2.0

List of Tables

Table 1-1: Luspatercept の毒性試験プログラム 5
Table 3.1.1-1: ラット 1 ヵ月間反復投与試験における TK 値 9
Table 3.1.2-1: ラット 3 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値） 12
Table 3.2.1-1: サル 1 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値） 13
Table 3.2.2-1: サル 3 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値） 15
Table 3.2.3-1: サル 6 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値） 16
Table 6.2.1-1: ラット胚・胎児発生用量設定試験における TK 値 20
Table 6.2.2-1: ラット胚・胎児発生に関する試験における母動物及び胚の TK 値 21
Table 6.2.3-1: ウサギ胚・胎児発生用量設定試験における母動物及び胚の TK 値 23
Table 6.2.4-1: ウサギ胚・胎児発生に関する試験における母動物及び胚の TK 値 24
Table 6.3.1-1: ラット出生前及び出生後の発生に関する試験における妊娠 20 日の胎児／母動物血清中濃度比 26
Table 6.4.1-1: 幼若ラット用量設定試験における TK 値（雌雄合算平均値） 28
Table 6.4.2-1: 幼若ラット毒性試験における生後 91 日の TK 値（雌雄合算平均値） 30
Table 9-1: 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 37

Approved v2.0

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
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(last)	area under the serum concentration-time curve from time zero to last quantifiable timepoint	投与開始から最終定量可能時点までの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 時間若しくは Y 日までの血清中濃度時間曲線下面積
BMP	bone morphogenetic protein	骨形成蛋白質
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CK	creatine phosphokinase	クレアチンホスホキナーゼ
Cmax	maximum serum concentration	最高血清中濃度
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
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 Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
LOAEL	lowest-observed-adverse-effect level	最小毒性量
MCH	mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球血色素量
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球血色素濃度
MCV	mean corpuscular volume	平均赤血球容積
MDS	myelodysplastic syndromes	骨髄異形成症候群
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	–

Approved v2.0

略号	英語	日本語
pSmad2	phospho Smad2	–
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）
RDW	blood cell distribution width	赤血球分布幅
SD	Sprague-Dawley	–
SOC	system organ class	器官別大分類
TEAE	treatment-emergent adverse event	試験治療下で発現した有害事象
TGF-β	transforming growth factor beta	トランスフォーミング増殖因子 β
TIM-1	T cell Ig mucin 1	T 細胞 Ig ムチン 1
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
Tmax	time to 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 まとめ

Luspatercept（別名 ACE-536、BMS-986346）はヒトアクチビン受容体 IIB 型（ActRIIB）の細胞外ドメインにヒト免疫グロブリン G1 結晶化フラグメント（IgG1 Fc）ドメインを結合した修飾体から構成される組換え融合蛋白であり、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赤血球成熟促進薬である。げっ歯類及びサルに薬理活性を示す【M2.6.2、2.2.1.1 項】ことから、一般毒性評価に用いる動物種として、げっ歯類はラット、非げっ歯類はカニクイザルを選択した。

Luspatercept の毒性試験として、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、生殖発生毒性試験、幼若動物を用いた毒性試験及びラットを用いた探索的な腎毒性試験を実施した。投与経路は、臨床投与経路が皮下であることから、特記した試験を除き同様の皮下投与により実施した。投与媒体には、特記する場合を除いて 10 mmol/L トリス緩衝生理食塩水（pH 7.2）を用いた。投与間隔は 2 週間に 1 回（Q2W）としたが、胚・胎児発生に関する試験のみは週 1 回（器官形成期に 2 回）投与とした。実施したすべての試験は、ラットを用いた腎毒性試験を除き、米国食品医薬品局（FDA）の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。

実施した毒性試験を Table 1-1 に示す。

Table 1-1: Luspatercept の毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP 適合	試験番号
反復投与毒性試験				
1 ヵ月間	皮下	ラット	適合	024488
3 ヵ月間	皮下	ラット	適合	20017484
1 ヵ月間	皮下、静脈内	サル	適合	WHH00067
3 ヵ月間	皮下	サル	適合	20017483
6 ヵ月間	皮下	サル	適合	20039148
生殖発生毒性試験				
受胎能及び初期胚発生に関する試験	皮下	ラット	適合	20040551
雌の受胎能及び初期胚発生及び回復性に関する試験	皮下	ラット	適合	ACE-536-TOX-2734
胚・胎児発生に関する用量設定試験	皮下	ラット	適合	20040547
胚・胎児発生に関する試験	皮下	ラット	適合	20040548
胚・胎児発生に関する用量設定試験	皮下	ウサギ	適合	20040549
胚・胎児発生に関する試験	皮下	ウサギ	適合	20040550
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	皮下	ラット	適合	ACE-536-TOX-2485

Approved v2.0

Table 1-1: Luspatercept の毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP 適合	試験番号
幼若動物を用いた毒性試験				
用量設定試験	皮下	ラット	適合	[redacted]-961002
最終試験	皮下	ラット	適合	[redacted]-961003
その他の毒性試験				
腎毒性試験	皮下	ラット	非適合	CC-DISC-TOX-2024

ラット及びサルを用いた試験の大部分で luspatercept 特異的な抗薬物抗体（ADA）が検出された。サルでは、ADA の発現頻度及び抗体価は概して低く、サル 6 ヵ月間試験で Day 183 以降に ADA 陽性を示した 1 例を除いて luspatercept の血清中濃度に顕著な影響は認められなかった。一方、ラット 3 ヵ月間反復経口投与毒性試験では、抗体価の高い ADA 陽性例が多くみられ、曝露量の減少がみられた。ADA はウサギでも少数検出され、これに伴い母動物及び胎児中 luspatercept 濃度の低下がみられた。

予測された luspatercept の薬理作用と一致した所見として、評価したすべての動物種で赤血球パラメータ（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、関連する組織学的所見を伴わない心臓及び肺の重量減少、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。

サル 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間試験で認められた重要な所見は、ラット試験で認められた腎臓の所見と同様に膜性増殖性糸球体腎炎であった。サルでは腎間質の線維化及び出血も認められた。6 ヵ月間試験で認められたその他の腎臓所見は、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・萎縮であった。これらの腎臓の所見は有害所見と判断され、ヒト臨床曝露量と同程度の曝露量で発現した。サルを用いた両試験において、免疫組織化学的検査により、免疫複合体の沈着を示唆する免疫グロブリン及び補体が腎臓に存在することが示されたが、これらの沈着物中に luspatercept は検出されず、影響が認められたサルの大部分は 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、免疫複合体沈着の関与の可能性も除外できなかったことから、臨床試験では腎機能に関するモニタリングを実施している。ヒト被験者において腎障害と luspatercept 投与との関連性を示唆する所見は報告されていない【M2.5、5.3.3.2 項】。

サル 6 ヵ月間試験ではさらに、脈絡叢の血管を含む間質に混合性炎症細胞浸潤が認められた。脈絡叢の免疫組織化学的検査により、間質における補体（C3）顆粒の増加が確認された。本所見は、免疫複合体の補体成分の泡沫状マクロファージによる処理の増加を示唆するものと推察された。これらの変化は回復性であった。サルにおける脈絡叢所見の臨床的意義は不明であるが、変化の程度は軽微で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。

Approved v2.0

腎障害の進行に対する luspatercept の作用を詳細に検討するため、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 を投与する探索的腎毒性試験を実施した。5/6 腎摘出モデルに luspatercept を 0.5 及び 5 mg/kg の用量で 3 ヵ月間 Q2W 皮下投与した結果、媒体を投与した 5/6 腎摘出モデル及び luspatercept を投与した偽手術群と比較して、糸球体及び尿細管間質性病変の顕著な悪化、形質転換成長因子 β（TGF-β）シグナル伝達マーカー［phospho Smad2（pSmad2）］及び上皮間葉転換マーカー［α 平滑筋アクチン（αSMA）］の免疫染色増加並びに尿中腎毒性バイオマーカー［アルブミン、オステオポンチン、T 細胞 Ig ムチン 1（TIM-1）］の増加が認められた。

胸腺退縮（皮質及び髄質のリンパ球枯渇）の発現頻度の増加がサル 3 ヵ月間試験で認められた。また、下顎リンパ節及び腋窩リンパ節の髄外造血がサル 6 ヵ月間試験で認められた。両所見ともカニクイザルに共通する背景所見であるが、luspatercept 投与との関連性は否定できなかった。しかし、いずれの所見も回復期間終了時には消失し、有害所見ではないと考えられた。

ラットの心臓及び肺重量の減少は、回復期間終了時には回復傾向又は完全な回復性を示した。副腎のうっ血及び壊死、胸腺のうっ血、肝臓の壊死及び軽微な胃鉱質沈着はラットのみに認められ、ラット及びサルで認められた膜性増殖性糸球体腎炎は、回復期間終了時にも認められた。サル 6 ヵ月間試験で認められた腎臓及び脈絡叢の病理組織学的所見は、12 週間の回復期間終了時までに完全な回復性又は回復傾向を示した。膜性増殖性糸球体腎炎に関連して、ラットでは投与期間中に血中尿素窒素（BUN）の増加、サルでは BUN、クレアチニン及び尿中アルブミン／クレアチニン比の増加がみられたが、回復期間終了時には投与前値に回復した。

胚・胎児発生に関する試験（用量設定試験及び本試験）を妊娠ラット及びウサギを用いて実施した。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に影響）を示し、ウサギでは母動物及び胎児に発生毒性（母動物及び胎児に影響）を示した。いずれの動物種においても、吸収胚数及び着床後胚損失率の増加、同腹児数の減少が認められた。ラット及びウサギのいずれにおいても骨格変異の発現頻度増加も認められた。ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験では、平均黄体数及び着床数の有意な減少がみられ、ラット胚・胎児発生に関する試験と同様に luspatercept を投与群で生存胚数が減少した。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。追加試験を実施してこれらの影響の回復性を評価した結果、luspatercept 投与群の雌で認められた受胎能への悪影響は 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に関する試験では、すべての投与量で F1 出生児に体重減少及び腎臓の毒性所見が認められたが、行動指標、受胎能及び生殖能への影響は雌雄ともに認められなかった。

幼若ラットを用いた試験では、認められた所見は概して成熟ラットで認められた所見と同様であった。幼若ラットのみにみられた所見は、生後 7 日から luspatercept を投与した出生児で両側性尿細管

Approved v2.0

萎縮及び腎臓髄質内層外側部の形成不全であった。そのほか、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。

後肢・足蹠の腫脹がラット及びウサギの試験（幼若動物及び生殖発生毒性試験を含む）で観察された。幼若ラットの 1 例では、本所見に関連して病理組織学的検査で新骨形成、線維症及び炎症が認められた。

幼若ラットの 3 例に血液悪性腫瘍（各 1 例にリンパ腫、骨髄性白血病及びリンパ性白血病）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加齢ラットでよくみられるが、これらの腫瘍が 26 週齢未満で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 ヵ月間試験で高用量（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、この腫瘍は自然発生性のもので luspatercept 投与との関連性はないと判断された。これらの血液腫瘍発生以外に腫瘍性、増殖性及び前腫瘍性病変は成熟ラット及びサルの試験で認められていない。幼若ラットと成人被験者の曝露量比較では、幼若ラット毒性試験での 10 mg/kg Q2W における曝露量は、成人被験者に最高臨床用量 1.75 mg/kg Q3W を投与したときの約 3.1 倍に相当する。血液悪性腫瘍所見と成人被験者との関連性は現時点では不明である。これまでに蓄積された臨床経験からは、luspatercept 投与患者における血液悪性腫瘍のリスク増加は示されておらず、実施中の試験では長期追跡調査が継続されている。血液悪性腫瘍のリスクは luspatercept の潜在的リスクと考えられ、長期モニタリングが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される。

以上に示した非臨床毒性試験により、luspatercept の非臨床安全性を評価した。これらの試験成績から、luspatercept を MDS における貧血の治療薬として使用することの妥当性が確認された。

2 単回投与毒性試験

Luspatercept の単回投与毒性試験は実施しなかった。

3 反復投与毒性試験

3.1 ラットを用いた試験

3.1.1 ラット 1 ヵ月間反復投与毒性及び 2 ヵ月間回復性試験

［4.2.3.2-1 試験番号 024488、概要表 2.6.7.7A］

Sprague-Dawley（SD）ラット（1 群雌雄各 15 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、6、20 及び 60 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回（Day 1 及び 15）、1 ヵ月間皮下投与した。さらにトキシコキネティクス（TK）評価用のサテライト群（1 群雌雄各 12 匹）を設け、同様に 6、20 及び 60 mg/kg の用量で Day 1 及び Day 15 に投与した。雌雄各 10 匹を Day 29 に剖検し、残りの雌雄各 5 匹を回復期間後の Day 92 に剖検した。

Approved v2.0

一般状態、摂餌量、眼科学的検査所見及び尿検査所見には、luspatercept に関連した影響は認められなかった。

Luspatercept の投与に関連すると考えられた変化を以下に示す。

- 軽微な体重減少（雄 60 mg/kg で Week 1 から、雄 20 mg/kg で Week 2 及び Week 3 に発現、投与期間終了後に完全に回復）
- 用量に依存した赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット及び赤血球分布幅（RDW）の増加並びに平均赤血球容積（MCV）及び平均赤血球ヘモグロビン（MCH）の減少（luspatercept の薬理作用と一致）
- 血小板容積増加（60 mg/kg）及び血小板数の減少（雄全用量、雌 60 mg/kg）
- 単球増加（60 mg/kg）、白血球及びリンパ球増加（雌 20 mg/kg 以上）、好塩基球増加（雌 60 mg/kg）
- アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アルカリホスファターゼ（ALP）若しくはアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）増加（雄全用量及び雌 20 mg/kg 以上）
- BUN 増加（60 mg/kg）、クレアチニン、カリウム、クレアチンホスホキナーゼ（CK）及び無機リン増加（雌 60 mg/kg）
- 心臓重量及び肺重量減少（6 mg/kg 以上、関連する組織学的変化なし）
- 腎臓の軽微～軽度の膜性増殖性糸球体腎炎（BUN、クレアチニン、カリウム、CK 及び無機リンの増加と関連）、肝臓の軽微～軽度な肝細胞凝固壊死（AST、ALT 及び ALP の増加と関連）、胃腺部の粘膜固有層の軽微～軽度の鉱質沈着（全用量）
- 副腎の軽微～軽度のうっ血（雄 60 mg/kg 及び雌全用量）、軽度～高度の壊死及び鉱質沈着（雌全用量）
- 胸腺の軽微な限局性又は多巣性うっ血の発現頻度増加（全用量、低用量では発現頻度が対照群よりわずかに高いのみであることから luspatercept 投与との関連性は不確か）

2 ヵ月間の回復期間後に luspatercept 投与と関連すると判断された変化を以下に示す。

- 糸球体腎炎及び胃の軽微～軽度な鉱質沈着（雄全用量及び雌 20 mg/kg 以上）、軽微～中等度の肝細胞壊死及び軽微な肝細胞の炎症（雄 60 mg/kg）、副腎の中等度の鉱質沈着及び壊死（雌 20 mg/kg 以上）、胸腺の軽微～中等度うっ血の発現頻度増加（雄 20 mg/kg 以上）
- ALP 及びリンの増加（雌 60 mg/kg）

本試験における luspatercept の各投与後の平均血清中 TK 値を Table 3.1.1-1 に要約する。

Table 3.1.1-1: ラット 1 ヵ月間反復投与試験における TK 値

投与量 (mg/kg)	Day 1				Day 15			
	Cmax (µg/mL)		AUC(0-336h) (µg·h/mL)		Cmax (µg/mL)		AUC(0-336h) (µg·h/mL)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
6	53.2	57.5	10791	12462	87.8	99.7	15792	17070

Approved v2.0

Table 3.1.1-1: ラット 1 ヵ月間反復投与試験における TK 値

投与量 (mg/kg)	Day 1				Day 15			
	Cmax (µg/mL)		AUC(0-336h) (µg·h/mL)		Cmax (µg/mL)		AUC(0-336h) (µg·h/mL)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
20	167.2	212.9	34811	39342	249.9	301.2	54551	48722
60	425.0	502.5	76906	91810	489.3	727.1	87770	104260

トキシコキネティクス解析の結果、ラットへの 2 週間間隔での 2 回皮下投与で luspatercept の血清中濃度は初回投与後 2 ヵ月間、用量依存的に維持されることが確認された。2 回目投与後と初回投与後の血清中濃度の比較により、蓄積が示唆された。Luspatercept 特異的抗体が全投与動物の 22%に検出され、検出率は全用量群で概して同程度であった。Luspatercept の血清中濃度推移は初回投与後 64 日間のみ評価し、抗体産生による影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験における無毒性量（NOAEL）は決定できなかった。

3.1.2 成熟及び若齢成熟ラット 3 ヵ月間反復投与毒性及び 10 週間回復性試験

［4.2.3.2-2 試験番号 20017484、概要表 2.6.7.7B］

Luspatercept を成熟 SD ラット（投与開始時約 17 週齢）に 1 mg/kg（雌雄各 10 匹）並びに 3 及び 15 mg/kg（各群雌雄各 15 匹）、若齢成熟ラット（投与開始時約 8 週齢）に 15 mg/kg（雌雄各 15 匹）の用量で、それぞれ 2 週間に 1 回、13 週間皮下投与した。さらに TK 評価用サテライト群（1 群雌雄各 6 匹）をそれぞれの週齢群に設け、同様に投与した。投与期間終了時（Day 93）に各群雌雄各 10 匹を剖検し、残りの雌雄各 5 匹を 10 週間の回復期間後（Day 162）に剖検した（1 mg/kg 群では回復性を評価せず）。成熟及び若齢成熟それぞれの対照群（1 群雌雄各 15 匹）には媒体を同様に投与した。

一般状態、眼科学的所見、摂餌量、体重、血液凝固系及び尿検査所見に luspatercept の影響は認められなかった。

毒性試験群の 7 例（0 mg/kg：3 例、15 mg/kg：4 例）及び TK 群の 1 例（1 mg/kg）が死亡発見又は早期安楽死させた。剖検所見及び採血との時間的関連性から、これらの早期死亡はいずれも luspatercept 投与との関連性はないと考えられた。

成熟ラットで luspatercept に関連性ありと判断された変化を以下に示す。

- 赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の用量に依存した軽微～軽度増加、網状赤血球数増加及びこれに関連した赤血球指数（MCH、MCV、MCHC、RDW）の変動（3 mg/kg 以上）

Approved v2.0

- 血小板数軽微減少（雄 15 mg/kg ）
- BUN 軽微増加（15 mg/kg）、血清グルコース減少（雄 15 mg/kg）
- 軽微～中等度の心臓重量減少（3 mg/kg 以上）、肝臓重量減少（雄 3 mg/kg 以上、雌 15 mg/kg）、腎臓重量減少（雄 3 mg/kg 以上）及び肺重量減少（雄 3 mg/kg 以上）（いずれも関連する組織学的変化なし）
- 病理組織学的変化
  - 副腎：軽微～中等度の皮質うっ血の用量に依存した発現頻度増加（全用量、雌で発現頻度及び変化の程度がより顕著）、軽微な束状帯皮質壊死（雌 1 及び 3 mg/kg）
  - 腎臓：軽微～軽度な膜性増殖性糸球体腎炎（全用量、毛細血管内及びメサンギウム細胞増殖増加、メサンギウム基質増加、毛細血管壁肥厚）
  - 肝臓：小葉中間帯肝細胞の軽微～軽度な空胞化（全用量）

若齢成熟ラット（15 mg/kg のみ）で luspatercept に関連性ありと判断された変化を以下に示す。

- 赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の軽微～軽度な増加並びに網状赤血球数の増加及びこれに関連した赤血球指数（MCH、MCV、MCHC、RDW）の変動（概して成熟ラットよりやや顕著）
- 血小板の軽微な減少（概して成熟ラットよりやや顕著）
- 白血球数、リンパ球数、単球数、好塩基球数の軽微な増加
- BUN 及び ALP の軽微な増加、血清グルコースの減少
- 軽微～中等度の心臓重量、肝臓重量、腎臓重量（雄）及び前立腺重量（雄）の減少、副腎重量（雌）の増加（副腎の変化を除いて関連する組織学的所見なし）
- 病理組織学的変化
  - 副腎：皮質の軽微なうっ血及び壊死、雌では中等度の鉱質沈着に関連した変化の程度増加及び髄質への散発的拡大病変（副腎重量増加と関連）
  - 腎臓：軽微～軽度な膜性増殖性糸球体腎炎
  - 小葉中間帯肝細胞の軽微~軽度な空胞化（雌）

肝臓の軽微な限局性又は多巣性肝細胞壊死が対照群及び luspatercept 投与群の雌で散見され、3 mg/kg 以上で発現頻度及び変化の程度がやや増加したが、概して関連するトランスアミナーゼの増加は認められなかった。本所見は対照群にも認められたことから、投与との関連性は明らかではない。

10 週間の回復期間後に luspatercept に関連性ありと判断された変化を以下に示す。

- 赤血球量の軽微増加（成熟ラット雌 3 及び 15 mg/kg）、白血球数の軽微増加（若齢成熟ラット雌 15 mg/kg）
- 心臓重量減少（成熟雄 3 mg/kg 以上、用量依存性なし）
- 副腎の軽微な皮質壊死（3 mg/kg で雌 1 例、15 mg/kg で成熟雄 2 例、15 mg/kg 若年成熟雌 1 例で中等度変化）、腎臓の軽微～軽度な膜性増殖性糸球体腎炎（全群）、肝小葉中間帯肝細胞の軽微～軽度な空胞化（15 mg/kg 成熟雄 2 例及び 15 mg/kg 若齢成熟雌 1 例）

Approved v2.0

心臓重量低下の分子機序を検討するため、心筋の成熟及び心筋細胞の大きさのマーカーとして α ミオシン重鎖（α-MHC）、β ミオシン重鎖（β-MHC）及び Brg-1 遺伝子の RNA 発現量を、対照群及び 15 mg/kg 群（成熟及び若齢成熟）について測定した。概して、評価した群の各標的遺伝子発現及び α-MHC/β-MHC 比に一貫した影響はみられなかった。

糸球体腎炎を詳細に検討するため、全投与群の雌雄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。3 及び 15 mg/kg の膜性増殖性糸球体腎炎に、ActRIIB 染色物質（luspatercept と解釈）、ラット IgG 若しくは補体 C3 を含有する顆粒状沈着物が認められた。このことから、投与動物における膜性増殖性糸球体腎炎の発現頻度の増加及び程度の亢進は、免疫成分の沈着と関連していることが示唆された。膜性増殖性糸球体腎炎が認められた luspatercept 投与動物では、足細胞が対照群と比較してやや大型化した。ラット IgM 及びアルブミンの顆粒状沈着は認められなかった。

初回投与後、成熟ラット及び若齢成熟ラットともに luspatercept の全身曝露量は 1～15 mg/kg の範囲でおおむね用量に比例して増加し、性差はみられなかった。試験期間中に ADA 陽性例が中等度の割合（47 例中 30 例、63.8%）で発生したため、7 回目投与（Day 85）後の TK 測定が可能な例数は限られた。19 例の曝露量は、高い ADA 抗体価に応じて ADA 陰性例の平均値よりも 2 標準偏差を超えて低く、Day 85 の評価から除外した。ADA 抗体価が低い 11 例では、AUC 個別値は低かったが平均値の 2 標準偏差の範囲内であり、Day 85 の TK 解析に含めた。Day 85 の TK 解析では、曝露量の用量に比例した蓄積性が示された（1.5～2.4 倍）。TK 測定値の雌雄合算平均値を Table 3.1.2-1 に要約する。

Table 3.1.2-1: ラット 3 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値）

投与量 (mg/kg)	投与開始時週齢	Day 1		Day 85 [a]	
		Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)
1	17	7.82	1615	12.64	3917
3	17	21.16	4006	19.86	6682
15	17	83.27	16660	100.67	30755
15	8	136.01	25503	131.14	37252

[a] 統計学的に外れ値と判断された個体の測定値は平均値算出から除外した

以上の成績に基づき、本試験の NOAEL は、投与期間終了時及び回復期間終了時に全用量で副腎及び腎臓の病理組織学的所見が認められたことから、決定できなかった。

3.2 サルを用いた試験

3.2.1 サル 1 ヵ月間反復皮下又は静脈内投与毒性及び 10 週間回復性試験

［4.2.3.2-3 試験番号 WHH00067、概要表 M2.6.7.7C］

Approved v2.0

カニクイザル（1 群雌雄各 3 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、0.4、2、10 及び 30 mg/kg の用量で Day 1 及び Day 15 に皮下投与又は 10 mg/kg の用量で静脈内投与し、Day 29 に剖検した。さらに雌雄各 2 匹に 0、10（皮下及び静脈内）及び 30 mg/kg（皮下）の用量で同様に投与し、10 週間休薬した後、Day 99 に剖検した。

いずれの投与経路でも、一般状態、体重、摂餌量及び器官重量に luspatercept の影響はみられなかった。また、心電図検査、神経学的検査、理学的検査、剖検及び病理組織学的検査で異常所見は認められなかった。

なお、30 mg/kg 回復群の雌 1 例を回復期間中（Day 68）に水様便及び摂餌量低下による状態悪化のため剖検したが、病理学的検査で死因を示唆する所見はみられず被験物質投与との関連性はないと判断された。

以下の変化は luspatercept の投与に関連した所見と考えられた。

- 赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット増加（Day 13 及び 28、2 mg/kg まで用量依存性、Day 99 までに回復傾向）
- BUN 軽微増加（30 mg/kg 及び静脈内 10 mg/kg）、クレアチニン軽微増加（雌 30 mg/kg）（組織学的変化を伴わず Day 99 までに回復）

Luspatercept を 2 週間に 1 回、合計 2 回皮下又は静脈内投与したときの曝露量はいずれの投与経路でも維持され、皮下投与では用量に比例して増加した。個体別の血清中濃度推移が全投与例の 9.5%（4/42 例）に検出された ADA の影響を受けなかったことから、ADA 産生は luspatercept の循環血からのクリアランスに影響を及ぼさないことが示された。ADA 反応は 3 例で一過性であったが、高用量群（30 mg/kg）の雌 1 例では回復期間終了時まで反応が持続した。この雌 1 例の陽性検体の追加検査で ADA 活性を確認できなかったため、抗体の特異性は決定できなかった（報告書番号 TR245【M4.2.3.2-3】）。皮下投与後の luspatercept のバイオアベイラビリティは 76%（10 mg/kg 皮下投与時と静脈内投与時の AUC の比較に基づく）であった。TK 測定値を Table 3.2.1-1 に要約する。

Table 3.2.1-1: サル 1 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値）

投与量 (mg/kg) ／投与経路	Day 1		Day 15		Day 15
	Cmax (µg/mL)	AUC(0-240h) (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-240h) (µg·h/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL) [b]
0.4 / 皮下	5.1	788	5.8	972	1169
2 / 皮下	29.5	4983	33.9	5839	7006
10 / 皮下	139	22921	182	27485	32316
10 / 静脈内 [a]	275	20786	440	26721	43297
30 / 皮下	404	65831	482	81733	97360

[a] 皮下投与の Cmax 及び AUC(0-240h) に相当する C(0)（投与後 0 時間の濃度）及び AUC(0-144h) を示す
[b] Memo WHH00067 TK analysis【M4.2.3.2-3】

Approved v2.0

本試験の NOAEL は、皮下投与で 30 mg/kg、静脈内投与で 10 mg/kg と考えられ、これらの用量における Day 15 の Cmax 及び C(0)はそれぞれ 482 µg/mL 及び 440 µg/mL、AUC(0-240h) 及び AUC(0-144h) はそれぞれ 81733 µg•h/mL 及び 26721 µg•h/mL であった。

3.2.2 サル 3 ヵ月間反復投与毒性及び 10 週間回復性試験

［4.2.3.2-4 試験番号 20017483、概要表 2.6.7.7D］

カニクイザル（1 群雌雄各 3 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、1、6 及び 30 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回、13 週間皮下投与し、Day 99 に剖検した。さらに雌雄各 2 匹に 0 及び 30 mg/kg の用量（媒体対照及び高用量）で同様に投与し、10 週間休薬した後、Day 162 に剖検した。

一般状態、摂餌量、体重、理学的検査（血圧、心拍数、呼吸数、体温）、心電図検査、眼科学的検査、凝固検査及び尿検査所見並びに器官重量に luspatercept の影響は認められなかった。

以下の変化は luspatercept 投与に関連した所見と考えられた。

- 赤血球量指標（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の軽微～中等度増加（最大 1.5 倍）及びこれに伴う網状赤血球数の増加及び関連する赤血球指標（RDW、MCHC 及び MCH）の変化（概して用量に依存し、雌より雄でやや顕著）
- 循環血中の有核赤血球（6 mg/kg 以上で数例に散見）、多染性赤血球及び赤血球大小不同の出現頻度及び程度増加（30 mg/kg）（赤血球産生増加に一致する所見）
- BUN 及びクレアチニン軽微増加（対照群の最大 2 倍、6 mg/kg 以上、Day 29 及び Day 98）、ALP 増加（雄 1 mg/kg 以上、雌 6 mg/kg 以上、Day 98）、フェリチン増加（雄 6 mg/kg 以上、雌 30 mg/kg、Day 98）（いずれも Day 161 までに回復）
- 腎皮質の暗色化（組織学的に出血と関連）及び腎皮質の菲薄化（間質の線維化と関連）（30 mg/kg 雄 2 例）
- 胸腺重量（絶対値及び相対値）減少（胸腺退縮と関連、雄 6 mg/kg 以上、雌 1 mg/kg 以上）
- 腎臓の膜性増殖性糸球体腎炎の発現頻度及び程度の増加（1 mg/kg 以上、用量依存性）、間質性出血及び線維化（30 mg/kg、主に雄）（6 mg/kg 以上での BUN 及びクレアチニン増加と関連して機能障害が示唆され、回復期間終了時にも持続）
- 胸腺退縮の発現頻度増加（全用量、回復期間終了時に消失）

糸球体腎炎を詳細に検討するため、対照群並びに 6 及び 30 mg/kg 群の腎臓切片について免疫組織化学的検査を実施した（1 mg/kg 群は評価せず）。1 種以上の免疫蛋白質（IgM、IgG 若しくは C3）を成分とする顆粒状沈着物が luspatercept 投与群の糸球体メサンギウムに認められた。組織学的に変化した糸球体では、沈着が正常糸球体より多く認められた。上皮下若しくは内皮下の顆粒沈着の頻度は低かった。これらの所見は媒体対照群では認められなかった。また、抗ヒト ActRIIB 免疫検出試薬を用いて 6 及び 30 mg/kg 群の各 1 例について luspatercept の ActRIIB 成分を検出した結果、少数の

Approved v2.0

拡張尿細管上皮に染色がみられたが、その意義は明らかでない。また、主に糸球体毛細血管内の赤血球に ActRIIB 及び C3 染色の増加が認められた。これらの染色も媒体対照群では認められなかった。

Luspatercept の血清中濃度は用量に依存して維持され、曝露量に顕著な性差は認められなかった。Luspatercept を投与した 22 例中 2 例（いずれも 30 mg/kg 群）に低力価の ADA 反応が認められた。薬物動態解析では、これら 2 例の初回投与と最終投与の間でクリアランスに差は認められず、ADA 産生によるクリアランスへの影響は小さいことが示唆された。TK 測定値を Table 3.2.2-1 に要約する。

Table 3.2.2-1: サル 3 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値）

投与量 (mg/kg)	Day 1		Day 85	
	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)
1	20.1	4195	25.8	5607
6	111	22877	301	53448
30	393	74617	696	129535

以上の成績から、本試験の NOAEL は、6 mg/kg 以上でみられた BUN 及びクレアチニンの増加並びに腎臓の病理組織学的所見に基づき、1 mg/kg と考えられた。本用量における Day 85 の Cmax は 25.8 µg/mL、AUC(0-336h) は 5607 µg•h/mL（雌雄合算平均値）であった。

3.2.3 サル 6 ヵ月間反復投与毒性及び 3 ヵ月間回復性試験

［4.2.3.2-5 試験番号 20039148、概要表 2.6.7.7E］

カニクイザル（1 群雌雄各 5 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、0.3、1 及び 6 mg/kg の用量で 2 週間に 1 回、6 ヵ月間皮下投与した。6 ヵ月間の投与期間終了時（Day 197）に各群雌雄各 3 匹を剖検し、残りの各群雌雄各 2 匹は 3 ヵ月間の回復期間後（Day 281）に剖検した。

一般状態、摂餌量、体重、理学的検査（血圧、心拍数、呼吸数、体温）、眼科学的検査、凝固検査、尿検査及び剖検所見並びに器官重量に luspatercept の影響は認められなかった。

以下の変化は luspatercept 投与に関連した所見と考えられた。

- 循環血中赤血球量指標（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の軽微～軽度増加（Day 29 から投与期間終了時まで持続）
- 網状赤血球数の増加並びに MCV 及び MCH の減少［6 mg/kg 雄（Day 196）及び雌（Day 29）］
- RDW の増加（雄 1 mg/kg 以上、雌 6 mg/kg）
- 単球の軽微増加［雄 1 mg/kg（Day 29～169）及び 6 mg/kg（Day 85～196）、雌 0.3 mg/kg（Day 85～169）、1 mg/kg（Day 85～196）及び 6 mg/kg（Day 85、169～196）］
- クレアチニン軽微増加（1 mg/kg 以上）及び BUN 軽微増加（6 mg/kg）
- ALP の軽微増加（雄のみ）及びフェリチンの軽微増加：6 mg/kg

Approved v2.0

- 尿中アルブミン／クレアチニン比の軽度～中等度増加（雌 1 mg/kg 1 例、雌雄 6 mg/kg 各 1 例、Day 29～196）
- 腎臓の膜性増殖性糸球体腎炎（1 mg/kg 以上、用量依存性）、間質の線維化・線維増殖（6 mg/kg）、軽微な間質性変化（細胞外基質増加、間質細胞空胞化、髄質及び皮髄境界部付近尿細管の変性・萎縮など、1 mg/kg 以上）、軽微～軽度の間質性混合炎症細胞浸潤（6 mg/kg）
- 脳（脈絡叢）の血管変性、色素沈着（ヘモジデリン）、好酸性蛋白様物質沈着、混合性炎症細胞浸潤（少数の好中球、マクロファージ、リンパ球、形質細胞含む）、泡沫状（空胞化）マクロファージ浸潤（1 mg/kg 以上）

その他、0.3 mg/kg 以上で下顎及び腋窩リンパ節の髄外造血が認められた。本所見は本試験に使用した年齢のカニクイザルによくみられる背景所見であるが、luspatercept の薬理作用から投与による影響の可能性も否定できず、本所見と luspatercept 投与との関連性は不確かであった。

試験中に認められた所見は、6 mg/kg での腎臓所見を除き、Day 281 までに回復傾向又は完全な回復性を示した。

サルの IgG 及び IgM 並びに補体 C3 の免疫組織化学検査を、1 及び 6 mg/kg 群の一部個体の腎臓及び脳（脈絡叢）のパラフィン切片について実施した。免疫組織化学的検査の結果、糸球体病変の組織学的部位とサルの IgG、IgM 若しくは C3 含有顆粒沈着物の増加との関連性が、膜性増殖性糸球体腎炎が認められた luspatercept 投与群 10 例中 8 例の糸球体病変部の膜内やメサンギウム領域で確認されたが、対照群では認められなかった。IgM、IgG 及び C3 の非顆粒性染色の増加は、一部の病変糸球体の遠位曲尿細管の糸球体外メサンギウムや緻密斑領域にも認められた。また、免疫組織化学染色により、脈絡叢に変化がみられた luspatercept 投与群 8 例中 4 例の脈絡叢間質に C3 顆粒の増加が認められた。顆粒の増加は、細胞外に認められたほか、泡沫状（空胞化）マクロファージ表面に散見された。IgG、IgM 若しくはアルブミン染色の増加は、脈絡叢間質の蛋白沈着の増加が認められた luspatercept 投与群の数例に認められた。脈絡叢の C3 顆粒の増加は、補体成分の泡沫状マクロファージによる処理の増加を示唆するものと考えられた。

Luspatercept の皮下投与後、全身曝露量は用量に比例して増加し、性差は認められなかった。Luspatercept を投与した 30 例中、0.3 mg/kg 群の 1 例に ADA 反応が認められた（発現率 3.3%）。本例では Day 127～232 に ADA が検出され、最終投与後の TK 値に影響が認められた。そのため、本例の測定値を Day 183 の群平均値から除外した。TK 値を Table 3.2.3-1 に要約する。

Table 3.2.3-1: サル 6 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値）

投与量 (mg/kg)	Day 1		Day 85		Day 183	
	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)
0.3	3.87	866	5.55	1209	5.4	1228
1	12.2	2569	18.0	4160	19.7	4412

Approved v2.0

Table 3.2.3-1: サル 6 ヵ月間反復投与試験における TK 値（雌雄合算平均値）

投与量 (mg/kg)	Day 1		Day 85		Day 183	
	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg·h/mL)
6	70.9	14891	97.4	20677	111	21627

以上より、本試験の NOAEL は、1 mg/kg 以上の用量で有害と判断された腎臓の病理組織学的所見が認められたことから 0.3 mg/kg と推定された。本用量における Cmax は 5.4 µg/mL、AUC(0-336h) は 1228 µg•h/mL（雌雄合算平均値）であった。

4 遺伝毒性試験

Luspatercept は生物学的製剤であり、医薬品規制調和国際会議（ICH）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「従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものでなく必要とされない。」と記載されていることに基づき、遺伝毒性試験は実施しなかった。

5 がん原性試験

遺伝毒性試験と同様に、ICH S6(R1) ガイドラインに従って luspatercept のがん原性試験は実施しなかった。また、げっ歯類における luspatercept の免疫原性により、多くの個体では 3 ヵ月間を超える投与で毒性を評価できる曝露量への到達及び維持が困難である。これらのことに基づき米国及びEU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、骨髄性白血病及びリンパ性白血病、各 1 例）が最高用量（10 mg/kg）のみで認められた（6.4 項）。リンパ腫及び白血病は、ラット 2 年間がん原性試験では多くみられるが、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。本例以外、成熟ラット及びサルを用いた luspatercept の試験では腫瘍及び前癌病変は認められなかった。幼若ラットとヒト成人被験者との薬物動態の比較では、10 mg/kg を Q2W 投与した幼若ラットの曝露量は、1.75 mg/kg を Q3W 投与したヒトの 3.1 倍に相当した。

6 生殖発生毒性試験

胚・胎児の発生に関する評価では、げっ歯類としてラットを、非げっ歯類としてウサギを選択した。受胎能及び初期胚発生に関する評価、出生前及び出生後の発生に関する評価は、ラットを用いて実施した。

Approved v2.0

6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

6.1.1 ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

［4.2.3.5.1-1 試験番号 20040551、概要表 2.6.7.12A］

SD ラットに luspatercept を 0（媒体対照）、1、3 及び 15 mg/kg の用量で、雄（各群 25 匹）には交配 28 日前から交配期間中及び剖検前日まで 2 週間に 1 回（合計 4 回）、雌（各群 25 匹）には試験開始日（Day 1）、交配前の Day 15 及び妊娠 3 日に合計 3 回、それぞれ皮下投与した。

Luspatercept を投与した雌雄全例が計画剖検時まで生存した。Luspatercept 投与群の雄では、数週間の投与後に後肢の運動障害がみられた 15 mg/kg 群の雄 1 例以外に一般状態の変化はみられず、剖検所見、体重・体重増加量、摂餌量、交尾行動、受胎能、生殖器官重量、精子数及び精子運動性に、投与に関連した影響は認められなかった。また、投与群の雄と交配させた無処置の雌に胚発生への影響は認められなかった。

Luspatercept 投与群の雌では、2 週間の交配前期間中に投与に関連した一般状態の変化はみられず、剖検所見も認められなかった。

以下の所見は luspatercept 投与に関連した変化と考えられた。

- 妊娠期間中の 15 mg/kg 群母動物での後肢腫脹、後肢の運動障害及び握力反射の障害・消失の発現頻度の有意な増加
- 15 mg/kg での黄体数、着床数及び生存胚数の有意な減少

Luspatercept 投与群の雌における着床前及び着床後胚損失率に対照群との有意な差は認められなかったことから、15 mg/kg で認められた着床数及び生存胚数の減少は黄体数の減少に関連したものであり、着床前及び着床後胚損失率の増加によるものではないことが示唆された。

以上より、雄親動物の一般毒性及び生殖毒性に関する NOAEL は 15 mg/kg と考えられた。母動物の一般毒性及び生殖毒性に関する NOAEL は、15 mg/kg で後肢の有害所見並びに黄体数、着床数及び生存胚数の減少がみられたことから、いずれも 3 mg/kg と考えられた。これらの用量における曝露量（AUC(0-336h)）は、ラット 3 ヵ月間試験（3.1.2 項）の曝露量に基づき、15 mg/kg（雄）で 30755 µg•h/mL、3 mg/kg（雌）で 6682 µg•h/mL と推定された。

6.1.2 雌ラット受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

［4.2.3.5.1-2 試験番号 ACE-536-TOX-2734、概要表 2.6.7.12B］

ラット皮下投与受胎能及び初期胚発生試験（6.1.1 項）で luspatercept 投与群の雌に認められた受胎能への有害作用の回復性を評価するため、雌ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する追加試験を実施した。雌 SD ラット（1 群 22 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）及び 15 mg/kg の用量で、Day 1、15 及び 29 に皮下投与した。媒体には、9%ショ糖及び 0.02%ポリソルベート 80 含有 10 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 6.3～6.7）を用いた。対照群と luspatercept 投与群は各 2 群設定し、それぞれにつ

Approved v2.0

いて 2 回目投与後に無処置の雄（各群 22 匹）と同居させる群と、3 回目投与後 14 週間の回復期間後に無処置の雄（各群 22 匹）と同居させる群を設定した（合計 4 群）。Luspatercept の血清中濃度は、全群について Day 1、15 及び 29 に、さらに回復期間後同居群について回復期間の Week 2、4、6、8、10、12 及び 14 に測定した。また、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、プロゲステロン及びエストラジオールの測定を、全群について Day 15 及び同居後 13 日（妊娠 13 日）に、また回復期間後同居群について Day 127 及び妊娠 13 日に実施した。

全例が妊娠 13 日の計画剖検時まで生存した。一般状態、交配前及び妊娠時体重、交配前体重増加量、摂餌量、性周期、黄体形成ホルモン、エストラジオール、プロゲステロン、 黄体数、着床後胚損失率、吸収胚数及び剖検所見に、被験物質に関連すると考えられる変化は認められなかった。

Luspatercept 投与群の曝露量は投与期間を通して維持され、投与 48 時間後の曝露量は個体差が大きいものの 2 群間で概して同程度であった。

回復期間前にみられた以下の変化は luspatercept（15 mg/kg）の投与によるものと考えられ、雌性生殖器系への影響が示唆された。

- 投与に関連した有害所見
  - 着床前胚損失率増加（対照群 13.36%に対し 27.16%）、これに関連した着床数減少（対照群 14.4 に対し 10.8）及び生存胚数減少（対照 13.5 に対し 10.0）
  - 卵巣重量減少及び子宮重量減少（対照群と比較してそれぞれ−11.3%及び−24.5%）
  - 妊娠 13 日 FSH 濃度の対照群と比較して統計学的有意な減少（51%）
- 投与に関連するが有害でないと判断された所見
  - 妊娠体重の低値
  - 交配所要日数の延長（対照群 2.6 日に対し 3.3 日）

上記の所見はいずれも回復期間後同居群では認められなかったことから、luspatercept による雌受胎能への有害作用の完全な回復性が示された。

6.2 胚・胎児発生に関する試験

6.2.1 ラット胚・胎児発生用量設定試験

［4.2.3.5.2-1 試験番号 20040547、概要表 2.6.7.11］

胚・胎児発生に関する用量設定試験を雌 SD ラット（各群 6 匹）を用いて実施した。Luspatercept を 0（媒体対照）、3、15、30 及び 60 mg/kg の用量で妊娠 3 日及び 10 日に皮下投与し、妊娠 21 日に全生存例を剖検した。Luspatercept 投与群にサテライト群（各群 6 匹）を設定して TK 及び ADA を測定し、全例を妊娠 16 日又は 17 日に剖検した。

60 mg/kg 群の雌 1 例を四肢骨折が疑われる状態悪化により妊娠 13 日に剖検した。本死亡例に luspatercept 投与との関連性はないと判断された。

Approved v2.0

母動物の一般状態、摂餌量及び剖検所見並びに胎児の外表検査所見に luspatercept の影響は認められなかった。

以下の所見は luspatercept の投与に関連した変化と考えられた。

- 同腹生存胎児数の減少（60 mg/kg、試験実施施設背景値範囲内）
- 同腹吸収胚数の増加（30 mg/kg 以上、試験実施施設背景値範囲を超える）
- 胎児体重の減少（30 mg/kg 以上、試験実施施設背景値範囲未満）

妊娠 3 日及び 10 日の皮下投与後の luspatercept の Cmax 及び AUC(last)は、用量に比例して増加し、2 回目投与後にわずかな蓄積が認められた。妊娠 16 及び 17 日の母動物に ADA 反応は認められなかった（循環血中の luspatercept が抗体の検出に影響を及ぼした可能性も考えられる）。妊娠ラットにおける TK 測定値を Table 6.2.1-1 に要約する。

Table 6.2.1-1: ラット胚・胎児発生用量設定試験における TK 値

採血日	用量 (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC(last) (µg·h/mL) [a]	推定 AUC(0-336h) (µg·h/mL) [b]
妊娠 3 日	3	24.5	2176	算出せず
	15	107	10033	
	30	214	20063	
	60	381	36859	
妊娠 10 日	3	32.4	3618	7236
	15	154	14538	29076
	30	272	26428	52856
	60	480	49412	98824

[a] 投与開始から最終定量可能時点までの血清中濃度時間曲線下面積（妊娠 3 日は 120 時間、妊娠 10 日は 168 時間）
[b] 1 週間に 1 回投与の AUC(0-168h) から外挿

本試験の成績に基づき、ラット胚・胎児発生に関する最終試験の用量は、高用量として 30 mg/kg、低用量として 5 mg/kg が推奨された。

6.2.2 ラット胚・胎児発生に関する試験

［4.2.3.5.2-2 試験番号 20040548、概要表 2.6.7.13A］

雌 SD ラット（各群 25 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、5、15 及び 30 mg/kg の用量で妊娠 3 日及び 10 日に皮下投与した。TK 測定用サテライト群（媒体対照群 3 匹、投与群各 6 匹）にも同様に投与した。全生存例を妊娠 21 日に剖検した。

Approved v2.0

全例が計画剖検時まで生存した。母動物の体重、体重増加量（妊娠子宮重量で補正）、摂餌量並びに卵巣所見及び子宮内容物、胎児の性別、外表及び内臓検査所見に、luspatercept 投与に関連した影響は認められなかった。

以下の所見は luspatercept 投与に関連した変化と考えられた。

- 30 mg/kg の 2 例で後足趾及び後肢の軽度な変色、指の弯曲、運動障害及び腫脹、握力反射障害、円背位、軽度脱水
- 30 mg/kg で妊娠 18 日～21 日の体重増加抑制（妊娠子宮重量による補正なし）
- 5 mg/kg 以上で子宮重量減少
- 30 mg/kg の 2 例で片側の腎臓周囲に透明液を満たした嚢胞
- 30 mg/kg で同腹胎児数及び生存胎児数の減少、同腹吸収胚数及び着床後胚損失率の増加（いずれも統計学的に有意でないが試験施設背景値範囲を逸脱）、30 mg/kg で妊娠数の減少
- 15 mg/kg 以上で胎児体重の有意な減少
- 15 mg/kg で骨格変異（非対称性胸骨中心）を有する胎児数及び同腹児数の有意な（試験施設背景値を超える）増加（30 mg/kg では同様の変異が認められなかったが、胚・胎児死亡の増加に起因する可能性）

Luspatercept の皮下投与後、Cmax 及び AUC は用量に比例して増加した。Luspatercept 投与群で 3 例（15 mg/kg で 2 例、30 mg/kg で 1 例）に ADA 陽性反応が認められた。この ADA 反応では抗体価を決定できなかったが、スクリーニングのシグナル／ノイズ比は全て 2 倍以下であり抗体が低親和性又は少量であることが示唆された。これらの ADA 陽性例では妊娠 10 日の投与後も luspatercept の血清中濃度を測定可能であった。妊娠 18 日又は 20 日では、血清中の luspatercept が ADA 検出に影響を及ぼした可能性がある。妊娠 21 日の luspatercept 投与群から得た同腹児のプール血清中に luspatercept が検出され、5、15 及び 30 mg/kg の濃度はそれぞれ 1.19、1.38 及び 3.61 µg/mL であった。母動物の妊娠 20 日の血清中濃度は、5、15 及び 30 mg/kg でそれぞれ 0.982、1.20 及び 6.41 µg/mL であった。

妊娠ラット及び胎児の血清中 TK 測定値を Table 6.2.2-1 に要約する。

Table 6.2.2-1: ラット胚・胎児発生に関する試験における母動物及び胚の TK 値

採血日	用量 (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-168h) (µg·h/mL)	推定 AUC(0-336h) (µg·h/mL) [a]
妊娠 3 日	5	45.5	5818	11636
	15	130	15750	31500
	30	262	28543	57086
妊娠 10 日	5	58.2	6166	12332
	15	171	16128	32256
	30	326	34488	68976

Approved v2.0

Table 6.2.2-1: ラット胚・胎児発生に関する試験における母動物及び胚の TK 値

		母動物の血清中濃度（妊娠 20 日）(μg/mL) [b]	胚のプール血清中濃度（妊娠 21 日）(μg/mL)	胚／母動物血清中濃度比
妊娠 20 日／21 日	5	0.982	1.19	1.21
	15	1.20	1.38	1.15
	30	6.41	3.61	0.56

[a] 1 週間に 1 回投与の AUC(0-168h) から外挿
[b] 妊娠 10 日投与後 240 時間

以上より、妊娠 3 日及び 10 日に luspatercept を最高用量 30 mg/kg まで投与した妊娠ラットに全身毒性及び補正体重（子宮重量を除外）への影響は認められなかった。15 及び 30 mg/kg の用量では胎児体重の低値を含む発生毒性が認められた。15 mg/kg で骨格変異の発現頻度が増加し、30 mg/kg では胚・胎児死亡が増加した。Luspatercept 投与に関連する奇形の発生は認められなかった。これらの成績に基づき、luspatercept はラットにおいて選択的な発生毒性を示すと判断された。胚・胎児発生への影響に関する NOAEL は 5 mg/kg と考えられ、本用量における母動物の妊娠 10 日の Cmax は 58.2 μg/mL、AUC(0-168h) は 6166 μg•h/mL（推定 AUC(0-336h)：12332 μg•h/mL）であった。

6.2.3 ウサギ胚・胎児発生用量設定試験

［4.2.3.5.2-3 試験番号 20040549、概要表 2.6.7.11］

用量設定試験を雌 New Zealand White（NZW）ウサギ（各群 5 匹）を用いて実施した。Luspatercept を 0（媒体対照）、10、25 及び 40 mg/kg の用量で妊娠 4 日及び 11 日に皮下投与した。TK 測定用サテライト群（luspatercept 投与各群 3 匹）にも同様に投与した。全生存例を妊娠 29 日に剖検した。

全例が妊娠 29 日の計画剖検時まで生存し、全例の妊娠が確認された。

一般状態、剖検所見、母動物体重及び帝王切開所見に luspatercept 投与に関連した影響は認められなかった。

以下の変化は luspatercept 投与に関連した所見と考えられた。

- 40 mg/kg で妊娠 4 日～29 日の摂餌量減少
- 25 及び 40 mg/kg で総胎児体重の減少（40 mg/kg の平均胎児体重は試験施設背景値未満）

妊娠 4 日及び 11 日の皮下投与後の luspatercept の Cmax 及び AUC は、10～40 mg/kg の範囲で概して用量に比例して増加した。ADA の検出は高濃度の luspatercept により阻害された可能性があるものの、TK 群では ADA は検出されなかった。一方、主試験群では 10 mg/kg 群の 1 例で妊娠 29 日に ADA 陽性が確認された。胎児から luspatercept が検出され、同腹児の平均濃度は 2.85～14.6 μg/mL であった。胎児中濃度に用量依存性はみられず母動物の血清中濃度と一致し、胎児のプール血清中濃度は

Approved v2.0

同時点で採取した母動物の血清中濃度の約 50～130%であった。妊娠ウサギ及び胎児の TK 測定値を Table 6.2.3-1 に要約する。

Table 6.2.3-1: ウサギ胚・胎児発生用量設定試験における母動物及び胚の TK 値

採血日	用量 (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-168h) (µg·h/mL)	推定 AUC(0-336h) (µg·h/mL) [a]
妊娠 4 日	10	91.6	11465	22930
	25	231	28454	56908
	40	310	38279	76558
妊娠 11 日	10	154	18771	37542
	25	353	43327	86654
	40	454	59955	119910
		母動物の血清中濃度 (µg/mL) [b]	胚のプール血清中濃度 (µg/mL)	胚／母動物 血清中濃度比
妊娠 29 日	10	3.45	4.42	1.3
	25	14.23	9.73	0.7
	40	16.18	7.83	0.5

[a] 1 週間に 1 回投与の AUC(0-168h) から外挿
[b] 妊娠 11 日投与後 432 時間

本試験の成績に基づき、ウサギの胚・胎児発生に関する最終的試験の推奨用量は、5、20 及び 40 mg/kg と考えられた。20 mg/kg は母動物の一般毒性及び胚・胎児発生に関していずれも NOAEL であり、40 mg/kg は軽度な母動物毒性及び発生毒性を示す用量と予測された。

6.2.4 ウサギ胚・胎児発生に関する試験

［4.2.3.5.2-4 試験番号 20040550、概要表 2.6.7.13B］

雌 NZW ウサギ（各群 25 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、5、20 及び 40 mg/kg の用量で妊娠 4 日及び 11 日に皮下投与し、妊娠 29 日に全生存例を剖検した。TK 測定用サテライト群（各群 3 匹）にも同様に投与した。

Luspatercept 投与に関連した死亡例はみられなかった。対照群の 1 例が妊娠 25 日に流産し、状態悪化により安楽死させた。Luspatercept に関連した外表、内臓及び骨格の奇形は認められなかった。

以下の変化は luspatercept 投与に関連した所見と考えられた。

- 排糞量減少、眼瞼腫脹及び眼の充血（20 mg/kg 以上）
- 削痩、流涙、結膜発赤、注射部位落屑、眼瞼下垂、赤色尿並びに泌尿生殖器、口周囲及び顔面の腫脹（40 mg/kg）前肢の運動障害及び歩行異常（40 mg/kg 母動物 1 例）

Approved v2.0

- 妊娠 4 日～29 日の体重増加抑制及び妊娠 29 日の体重減少（20 mg/kg 以上、40 mg/kg では補正母動物体重も減少）
- 摂餌量の減少（20 mg/kg 以上）
- 胎児体重の低値による子宮重量の減少（20 mg/kg 以上）
- 胚吸収がみられた母動物数の増加（20 mg/kg 以上）
- 同腹児数及び生存同腹児数の減少、吸収胚数及び着床後胚損失率の増加（40 mg/kg）
- 胎児体重の減少（20 mg/kg 以上）
- 舌骨及び胸骨分節の骨格変異を有する 1 腹同腹児数、胎児数及び同腹児発生率の増加（40 mg/kg）
- 胎児の体重低値に関連した前肢指骨の骨化部位数の減少（40 mg/kg）

妊娠 4 日及び 11 日の投与後の luspatercept の Cmax 及び AUC は、5～20 mg/kg の間で用量比を下回って増加し、20～40 mg/kg の間では用量に比例して増加した。試験期間を通して luspatercept の曝露量は維持され、2 回目投与後にわずかな蓄積（1.5～1.8 倍）が認められた。妊娠 29 日の luspatercept 投与群から得た同腹児のプール血清中に luspatercept が検出され、各同腹児の濃度は検出下限未満～18.3 µg/mL の範囲であった。胎児の luspatercept 濃度はそれぞれの母動物の妊娠 29 日の濃度と概して同程度であり、ADA 産生により luspatercept の曝露量が低下した 2 例（5 及び 20 mg/kg 群各 1 例）においても胎児のプール血清中濃度は同様に低値であった。これら 2 例では 2 回目投与後に TK 値が変動したため妊娠 11 日の母動物平均血清中濃度及び妊娠 29 日の同腹児平均プール血清中濃度の算出から除外した。胎児のプール血清中濃度は、同時点で採取した母動物血清中濃度の 30%～90%であった。母動物及び胎児の TK 測定値を Table 6.2.4-1 に要約する。

Table 6.2.4-1: ウサギ胚・胎児発生に関する試験における母動物及び胚の TK 値

採血日	用量 (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-168h) (µg·h/mL)	推定 AUC(0-336h) (µg·h/mL)[a]
妊娠 4 日	5	59.1	7794	15588
	20	179	22216	44432
	40	370	47160	94320
妊娠 11 日	5[b]	91.1	12420	24840
	20[b]	279	36314	72628
	40	616	75690	151380
		母動物の血清中濃度 (µg/mL)[c]	胚のプール血清中濃度 (µg/mL)	胚／母動物 血清中濃度比
妊娠 29 日	5[b]	3.9	3.46	0.9
	20[b]	19.2	4.86	0.3
	40	13.6	12.5	0.9

[a] 1 週間に 1 回投与の AUC(0-168h) から外挿
[b] ADA 陽性を示した 5 及び 20 mg/kg 群各 1 例を妊娠 11 日の母動物平均血清中濃度及び妊娠 29 日の同腹児平均プール血清中濃度の算出から除外

Approved v2.0

[c] 妊娠 11 日投与後 432 時間

以上より、妊娠 4 日及び 11 日に luspatercept を皮下投与した妊娠ウサギにおいて、20 及び 40 mg/kg で母動物毒性及び発生毒性が認められた。これらの成績に基づき、母動物の一般毒性及び胚・胎児の発生に関する NOAEL はいずれも 5 mg/kg と考えられ、本用量における Cmax は 91.1 µg/mL、AUC(0-168h)は 12420 µg•h/mL（推定 AUC(0-336h)：24840 µg•h/mL）であった。

6.3 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

6.3.1 ラット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

［4.2.3.5.3-1 試験番号 ACE-536-TOX-2485、概要表 2.6.7.14］

交配済み雌 SD ラット（各群 22 匹、F0 世代）に luspatercept を 0（媒体対照）、3、10 及び 30 mg/kg の用量で妊娠 6 日及び 20 日並びに妊娠 20 日投与の 14 日後（2 週間に 1 回、合計 3 回）に皮下投与した。媒体には、9%ショ糖、0.02%ポリソルベート 80 含有 10 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 6.3～6.7）を用いた。TK 測定用サテライト群（各群 6 匹）は妊娠 6 日及び 20 日に投与した。次世代（F1）の評価には各群から雌雄各 22 匹を選抜して評価に用いた。

30 mg/kg 群の F0 雌 1 例を妊娠 12 日に状態悪化により安楽死させ、30 mg/kg 群の F1 雄 1 例が Day 57 に死亡発見された。これらの状態悪化及び死亡は luspatercept の投与との関連性なしと判断された。これら 2 例の死亡例を除き、全例が計画剖検時まで生存した。

F0 雌の生存率、体重、妊娠率及び分娩指標（妊娠期間、出生児数及び同腹児数）に変化はみられなかった。哺育期間中の F1 出生児の生存率、一般状態、剖検所見及び腎臓重量（生後 28 日）、行動・感覚・発達に影響は認められなかった。また、F1 世代の生存率、一般状態、妊娠中の体重増加量、自発運動、学習及び記憶、雌の性成熟、生殖指標、妊娠 13 日の卵巣及び子宮観察所見並びに剖検所見に、検討したいずれの用量においても影響は認められなかった。

以下の変化は luspatercept の投与に関連した所見と考えられた。

- 投与に関連した有害所見
  - 雌雄 F1 出生児の出生時、哺育期間中及び離乳後（生後 28 日）の体重低値（全用量）
  - F1 雌の早期交配前期間（Week 1 及び 2）の体重低値（30 mg/kg）、F1 雄の交配前、交配及び交配後期間の体重低値［全用量、雄では以降の成長期間（交配前期間の Week 7）で回復傾向（対照群と比較して 10%以下）を示したが Week 13 まで低値（−6%～−7%）が持続］
  - F1 出生児の腎臓の病理組織学的所見（軽微な膜性増殖性糸球体腎炎、軽微～軽度な尿細管萎縮・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）（全用量）
- 投与に関連するが有害でないと判断された所見
  - F1 雌 1 例（30 mg/kg）の臨床症状及び剖検所見（足蹠の腫脹・肥厚）
  - F1 雄の性成熟遅延（10 mg/kg 以上）
  - F1 雌の交配前期間早期（Week 1 及び 2）の体重低値（3 mg/kg 以上）

Approved v2.0

– 妊娠 4 日～21 日の摂餌量減少（−6%～−12%）（30 mg/kg）

妊娠 20 日の投与 8 時間後における胎児の母動物との薬物濃度比は、3 及び 10 mg/kg では同程度であったが、30 mg/kg では低用量と比較して比は約 1/3 であった。妊娠 20 日の投与 24 時間後では、胎児の母動物との薬物濃度比は、各用量で同程度であった。胎児の母動物との濃度比を Table 6.3.1-1 に要約する。

Table 6.3.1-1: ラット出生前及び出生後の発生に関する試験における妊娠 20 日の胎児／母動物血清中濃度比

	胎児／母動物血清中濃度比	
用量 (mg/kg)	**投与 8 時間後**	**投与 24 時間後**
3	0.25	0.086
10	0.21	0.098
30	0.079	0.082

これらの所見に基づき、F0 世代の雌の一般毒性及び受胎能・生殖能に関する NOAEL は、評価した最高用量の 30 mg/kg と考えられた。F1 世代では、発育遅延及び腎臓の有害所見がみられたことから一般毒性に関する NOAEL を決定できなかった。一方、行動指標、受胎能及び生殖能に関してはいずれの用量でも雌雄ともに影響は認められなかったことから、F1 の行動、受胎能及び生殖能に関する NOAEL は 30 mg/kg と判断された。本用量における曝露量は、ラット胚・胎児発生に関する試験（6.2.2 項）の妊娠 10 日での曝露量から、AUC(0-168h)は 34488 µg•h/mL（推定 AUC(0-336h)：68976 µg•h/mL）と推定された。

6.4 新生児を用いた試験

6.4.1 幼若ラット用量設定試験

［4.2.3.5.4-1 試験番号[redacted]-961002、概要表 2.6.7.15A］

雌雄の幼若ラット（1 群雌雄各 6 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、1、6 及び 15 mg/kg の用量で、生後 7 日～56 日（生後 7 日群）又は生後 21 日～70 日（生後 21 日群）に 2 週間に 1 回（合計 4 回）、皮下投与し、生後 56 日（生後 7 日群）又は生後 70 日（生後 21 日群）に剖検した。さらに TK 及び免疫原性評価用サテライト群［1 群雌雄各 42 匹（生後 7 日群）又は 39 匹（生後 21 日群）］を設けた。

試験期間中、luspatercept 投与に関連した死亡例はみられなかった。いずれの用量でも摂餌量への影響は認められず、雄の亀頭包皮分離及び雌の膣開口の平均日齢への影響もみられなかった。

以下の変化は luspatercept 投与に関連した所見と考えられた。

- 生後 21 日群の雌 15 mg/kg 1 例で左右後肢の腫脹・運動障害の臨床症状

Approved v2.0

- 生後 7 日群の雄 6 mg/kg 以上で投与期間中（生後 7 日～56 日）の体重増加抑制
- 生後 7 日群及び 21 日群の全用量で赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の軽微増加、概して 6 mg/kg 以上で網状赤血球絶対数増加、赤血球指数の変化（RDW 増加、MCH、MCHC 及び MCV 減少）
- 生後 7 日群の雄 15 mg/kg で血小板数減少
- 生後 7 日群及び 21 日群の雌 6 mg/kg 以上並びに生後 7 日群の雄 15 mg/kg で白血球数増加
- 生後 7 日群雌雄及び 21 日群雄の 6 mg/kg 以上並びに 21 日群雌 15 mg/kg で ALP、ALT 及び AST の増加（関連する組織学的変化なし）
- 生後 7 日及び 21 日群の 6 mg/kg 以上で BUN、クレアチニン、リン及びカリウムの増加（腎障害の組織学的所見と関連）
- 生後 7 日群の雄 6 mg/kg 以上並びに生後 7 日群雌及び 21 日群雄の 15 mg/kg で尿中蛋白の軽微増加（腎障害の組織学的所見と関連）
- 生後 7 日群の雌 6 mg/kg 及び生後 21 日群の雌雄 15 mg/kg で副腎の暗赤色領域、斑紋状及び肥大並びにこれに関連した副腎索状帯のうっ血、出血、凝固壊死
- 生後 7 日群の雌雄 6 mg/kg 以上で腎臓の両側性尿細管萎縮及び髄質内層外側部形成不全、髄質外層内尿細管拡張の発現頻度及び程度の増加、生後 7 日及び 21 日群の雄 6 mg/kg 以上及び雌 15 mg/kg で皮質尿細管の好塩基性化及び慢性進行性腎症の発現頻度増加、生後 7 日及び 21 日群の雄 6 mg/kg 以上並びに生後 7 日群の雌 15 mg/kg で皮質尿細管の鉱質沈着の発現頻度増加、生後 7 日及び 21 日群の雌雄 6 mg/kg 以上で膜性増殖性糸球体腎炎並びにこれに関連した腎臓重量の減少
- 生後 7 日群雌雄及び 21 日群雄の 1 mg/kg 以上並びに生後 21 日群の雌 6 mg/kg 以上で胃腺粘膜の鉱質沈着の発生頻度及び変化の程度の増加（15 mg/kg では上皮の菲薄化・過形成を伴う粘膜構造の乱れ及び胃腺の拡張がみられたため有害所見と判断）、生後 7 日群雌の 6 mg/kg 以上で胃粘膜の表在性出血及び巣状凝固壊死の発現頻度及び変化の程度の増加（生後 7 日群の雌 6 mg/kg 以上及び生後 21 日群の雄 15 mg/kg でみられた腺胃の暗赤色領域と関連）
- 生後 7 日群及び 21 日群の雌 15 mg/kg で胸骨骨髄の骨髄球系／赤血球系比の軽微な低下（特徴的所見として、細胞数に変化なし、後期赤血球前駆細胞の増加、骨髄前駆細胞の減少、成熟分葉核好中球の相対的増加）
- 生後 21 日群の雌 1 mg/kg 以上並びに生後 7 日及び 21 日群の雌雄 6 mg/kg 以上で心臓重量減少、生後 7 日群の雌 6 mg/kg 以上及び雄 15 mg/kg で肝臓重量減少（関連する病理組織学的所見なし）

上記の腎臓の病理組織学的所見で生後 7 日群にみられた尿細管所見は髄質（幼若ラットの腎臓で最も成熟度が低く急速に発達する領域[1]）に分布し、本所見は生後 21 日群では認められなかったことから、luspatercept による髄質尿細管の発達への影響に対する感受性が週齢に依存することが示唆された。

幼若動物への投与後の曝露量（Cmax 及び AUC(0-336h)）は、生後 7 日及び 21 日投与開始のいずれも雌雄とも 1～15 mg/kg の範囲でおおむね用量に比例して増加した。Luspatercept の曝露量は試験期間を通して維持され、蓄積が認められた。ラットの成長とともにクリアランスの低下に伴って半減

Approved v2.0

期が延長した。投与後の ADA 反応は生後 21 日投与開始群の 7 例に認められた。生後 7 日群及び生後 21 日群の TK 測定値を Table 6.4.1-1 に要約する。

Table 6.4.1-1: 幼若ラット用量設定試験における TK 値（雌雄合算平均値）

用量 (mg/kg)	Cmax (µg/mL)		AUC(0-336h) (µg•h/mL)	
生後 7 日群	**生後 7 日**	**生後 49 日**	**生後 7 日**	**生後 49 日**
1	5.66	11.6	829	2392
6	38.2	66.9	4449	14319
15	98.0	145	11138	27225
生後 21 日群	**生後 21 日**	**生後 63 日**	**生後 21 日**	**生後 63 日**
1	15.5	13.3	1606	2375
6	57.6	73.8	8633	16581
15	142	165	19960	33840

以上より本試験の NOAEL は、6 及び 15 mg/kg での副腎及び腎臓の病理組織学的所見、15 mg/kg での胃の病理組織学的所見に基づき、生後 7 日及び生後 21 日のいずれの投与開始時期でも 1 mg/kg と考えられた。

6.4.2 幼若ラット毒性試験

［試験番号[redacted]-961003（M4.2.3.5.4-2）、毒性試験概要表 M2.6.7.15B］

雌雄幼若 SD ラット（1 群雌雄各 52 匹）に luspatercept を 0（媒体対照）、1、3 及び 10 mg/kg の用量で生後 7 日～91 日に 2 週間に 1 回、計 7 回皮下投与した。本試験の群構成は、主評価群（Subset 1、雌雄各 10 匹）、18 週間回復性評価群（Subset 2、雌雄各 22 匹）、免疫評価群（Subset 4、雌雄各 20 匹）とし、Subset 4 はさらに投与期間中評価群及び回復期間中評価群（それぞれ雌雄各 10 匹）に割付けた。加えて、TK 及び ADA 評価群（Subset 3）として、対照群（雌雄各 15 匹）及び luspatercept 投与群（雌雄各 42 匹）を設定した。また、生殖能評価のため、無処置の性成熟雌雄（1 群雌雄各 22 匹）を luspatercept 投与雌雄（Subset 2）と生後 203 日に交配させた。

雌 2 例（3 及び 10 mg/kg 各 1 例）を後肢腫脹により早期安楽死させた。後肢の腫脹、発赤及び歩行異常並びに後肢趾の腫脹は、機能障害がみられたことから有害所見と考えられた。これら 2 例以外の死亡は偶発的要因又は母動物の哺育放棄などによるものであり、luspatercept 投与との関連性はないと判断された。

以下の変化は luspatercept 投与に関連した有害所見と考えられた。

- 投与期間及び回復期間中の後肢の運動障害、足蹠の腫脹若しくは後肢の発赤（1 mg/kg 以上）

Approved v2.0

- 投与期間中の運動性の変化及び歩行スコア低下（後肢の運動障害に相当）の神経行動学的所見並びに体温低下（雄 10 mg/kg、回復期間中は発現せず）
- 包皮分離平均日齢の 2 日間遅延（雄 10 mg/kg）
- 無処置の雌及び雄との交尾率低下（雄 3 mg/kg 以上及び雌 1 mg/kg 以上）
- 腎臓の病理組織学的所見に関連した以下の血液生化学的検査及び尿検査所見
  - 総蛋白及びアルブミンの減少（雄 3 mg/kg 以上．尿中蛋白喪失に起因、回復期間中も持続）
  - 血清中 BUN 及びクレアチニンの増加（10 mg/kg、回復期間中に回復）
  - 尿中アルブミン／クレアチニン比の上昇（3 mg/kg 以上、回復期間中も持続）
  - 尿中蛋白の増加（雄 3 mg/kg 以上及び雌 1 mg/kg 以上、3 mg/kg 以上では回復期間中も持続）
  - 尿中バイオマーカー（Lipocalin-2 及び TIM-1）の増加（全用量、雄 10 mg/kg の TIM-1 増加は回復期間中も持続）
- 副腎の軽微～軽度な出血及び索状帯のうっ血、皮質の凝固壊死（散発的に形成異常性鉱質沈着を伴う）、皮質の線維増殖又は線維化（回復期間中も持続）（雌 1 mg/kg 以上）
- 腎臓の尿細管萎縮・髄質内層の低形成（3 mg/kg 以上、腎臓重量の減少と関連）、髄質内層外帯の尿細管拡張（10 mg/kg）、膜性増殖性糸球体腎炎（1 mg/kg 以上）、慢性進行性腎症の発現頻度・程度の増加（3 mg/kg 以上）、皮質尿細管の鉱質沈着の発現頻度増加（3 mg/kg 以上、回復期間中も持続）
- 中足骨の慢性炎症、線維化、軟骨化生及び骨膜新生骨形成（雄 10 mg/kg 1 例、右後肢の腫脹と関連）

以下の変化は luspatercept 投与に関連するが有害でない所見と考えられた。

- 摂餌量減少に関連した体重の低値及び体重増加抑制（雄 10 mg/kg）
- 赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの増加（1 mg/kg 以上、雄 10 mg/kg は回復期間終了時も持続）、MCV 及び RDW の減少（10 mg/kg）、MCH 減少（雄 10 mg/kg 及び雌 3 mg/kg 以上）、リンパ球数及び総白血球数の増加（雄 3 mg/kg 以上）、血小板数減少（雄 3 mg/kg 以上及び雌 10 mg/kg）
- CD 45+リンパ球、NK 細胞、B 細胞及び T 細胞絶対数の増加、10 mg/kg 雌で総 T 細胞比率の低下（3 及び 10 mg/kg、回復期間中に回復）
- 骨サイズ（面積）増加に比例しない骨塩量増加の低値（1 mg/kg 以上）並びにこれに関連した大腿骨骨幹端の骨密度減少（3 mg/kg 以上）及び大腿骨骨幹の骨密度減少（10 mg/kg）（10 mg/kg の変化は回復期間中に完全に回復せず）
- 胃粘膜の鉱質沈着（3 mg/kg 以上、回復期間中も持続）
- 心臓重量の低値（1 mg/kg 以上）及び肝臓重量の低値（雌 10 mg/kg）（いずれも関連する剖検及び病理組織学的所見なし）

さらに、10 mg/kg で 3 例にそれぞれ異なる 3 種の造血器腫瘍が認められた。すなわち、リンパ球性白血病が最初の剖検時に雄 1 例、顆粒球性白血病が生後 182 日に状態悪化により安楽死させた雄 1 例に、リンパ腫が生後 178 日に状態悪化により安楽死させた雌 1 例にそれぞれ認められた。3 種の腫瘍

Approved v2.0

はいずれも幼若ラットで発現頻度が低く、白血病は本試験で用いた系統及び週齢のラットでは特にまれである[2]。これらの腫瘍発生と luspatercept 投与との関連性は明らかでない。

生後 7 日の TK は測定できなかった。生後 91 日の投与後の測定では、性差はみられず、Cmax は 1～10 mg/kg の範囲で用量に比例して増加し、AUC(0-336h)は 1～3 mg/kg で用量に比例したが 3～10 mg/kg では用量比をわずかに下回った。ADA 陽性率は低く（7.8%）、0、1、3 及び 10 mg/kg でそれぞれ 1、4、1 及び 1 例に検出された。本試験の TK 値を Table 6.4.2-1 に要約する。

Table 6.4.2-1: 幼若ラット毒性試験における生後 91 日の TK 値（雌雄合算平均値）

用量 (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC(0-336h) (µg•h/mL)
1	10.4	2636
3	37.5	8486
10	94.1	20054

以上の所見に基づき、本試験の NOAEL は、F0 世代雌雄の一般毒性に関して 1 mg/kg 未満、F0 世代の生殖能に関して雄で 1 mg/kg、雌で 1 mg/kg 未満、F0 世代の発達及び神経行動学的影響に関して雄で 3 mg/kg、雌で 10 mg/kg、F0 世代の免疫学的影響に関して 10 mg/kg、さらに F1 世代の胚発生に関して 10 mg/kg と推定された。

7 局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施していない。ICH S6(R1) ガイドラインに従い、ラット及びサルの各反復投与毒性試験（3 項）において局所刺激性を評価した結果、luspatercept 投与に関連した影響は認められなかった。

8 その他の毒性試験

8.1 ラット腎障害モデルを用いた腎毒性試験

［4.2.3.7.3-1 試験番号 CC-DISC-TOX-2024（参考資料）、概要表 2.6.7.17］

腎障害の進行に対する luspatercept の作用を詳細に検討するため、2 種類のげっ歯類腎障害モデルである 5/6 腎摘出又は片側尿管結紮（UUL）のいずれかを施した雌の SD ラットに luspatercept を投与する腎毒性試験を実施した。それぞれの腎障害モデル（各群 6 匹）に、媒体（対照群）、luspatercept の 0.5 及び 5 mg/kg 又は RAP-536（luspatercept のマウス相同蛋白）の 10 mg/kg を 13 週間 Q2W 皮下投与した。5/6 腎摘出は Week 3 に、UUL は Week 11 に実施し、各投与群には偽手術群（各群 3 匹）を設定した。

試験期間中に被験物質投与に関連した死亡例は認められなかった。4 例が死亡発見されたが、これらの死因はストレス若しくは麻酔及び手術に起因する可能性が高いと考えられた。

Approved v2.0

赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）の増加が、5/6 腎摘出モデル（偽手術動物を含む）では luspatercept の全用量及び RAP-536 で、UUL モデル（偽手術ラットを含む）では luspatercept の 5 mg/kg 及び RAP-536 で認められた。赤血球量の増加は、UUL モデルと比較して 5/6 腎摘出モデルで顕著であった。UUL 手術は 5/6 腎摘出の約 8 週間後に実施されたことから、この差は UUL 手術から血液学的検査の最終採血までの時間が短かったことによるものである可能性が推察された。

体重及び摂餌量の一過性の減少が、両腎障害モデルの媒体対照群並びに luspatercept 及び RAP-536 投与群で認められた。5/6 腎摘出モデルの媒体対照群及び luspatercept 投与群では、血清中クレアチニン、BUN 及び尿量が増加した。UUL モデルでは、臨床病理検査値に投与に関連した変化は認められなかった。

尿中アルブミンが 5/6 腎摘出モデルの媒体対照群で増加し、luspatercept 及び RAP-536 投与群ではさらに増加した。また、5/6 腎摘出モデルでは luspatercept の 5 mg/kg 投与で尿中 TIM-1 が増加した。UUL モデルでは、全投与群で偽手術群と比較して TIM-1 が増加したが、媒体対照群と luspatercept 及び RAP-536 投与群との間に差は認められなかった。Lipocarin-2 の増加が 5/6 腎摘出モデルの被験物質を投与しない群でみられたが、luspatercept 又は RAP-536 投与群での更なる増加は認められなかった。UUL モデルの媒体対照群では尿中の lipocarin-2 が増加し、luspatercept 及び RAP-536 投与群では lipocarin-2 の増加がわずかに顕著であった。また、尿中 osteopontin が 5/6 腎摘出モデルの luspatercept 及び RAP-536 投与群で増加した。UUL モデルでは、媒体対照群及び被験物質投与群のいずれでも osteopontin の一貫した変化は認められなかった。

Luspatercept の 1 回目投与後の血清中濃度は 0.5 及び 5 mg/kg で概して用量に比例して増加した。Luspatercept の 5 mg/kg と RAP-536 の 10 mg/kg 投与後の平均薬物濃度（1 回目投与 4 時間後）は同程度であった。

各被験物質を投与した動物から採取した Day 92 の試料中に ADA が検出され、ADA 陽性率は luspatercept 投与群で 25%、RAP-536 投与群で 33%であった。ADA 陰性例では、最終投与 4 時間後の血清中薬物濃度は 1 回目投与 4 時間後より概して高値であり、蓄積が示された。最終投与後の血中薬物濃度は、ADA 陽性例の大部分で ADA 陰性例と比較して低下したことから、免疫原性により曝露量が低下することが示された。

5/6 腎摘出モデルの媒体投与群では腎臓の体積減少に関連して、糸球体の軽微～軽度な変化（肥大、細胞密度増加、メサンギウム基質増加、臓側上皮の肥大・過形成、メサンギウム融解）、軽微～軽度な皮質尿細管拡張がみられ、免疫組織化学でこれらに関連して糸球体（pSmad2、aSMA）、尿細管（pSmad2）及び尿細管間質（aSMA）の染色が増加した。同様の糸球体の変化は luspatercept 及び RAP-536 を投与した偽手術群でも観察され、これに関連して pSmad2 及び aSMA 免疫染色のわずかな

Approved v2.0

増加も認められた。また、尿細管間質の aSMA 免疫染色の軽微～軽度な増加が luspatercept（0.5 及び 5 mg/kg）の偽手術群で認められた。

5/6 腎摘出モデルの媒体投与群及び各薬物の偽手術群と比較すると、腎摘出モデルの luspatercept 及び RAP-536 投与群では、糸球体の変化の程度が顕著に増加した。これらの群では、さらに糸球体の硝子体蓄積、上皮性半月体形成、ボーマン嚢肥厚、ボーマン腔拡張及び糸球体萎縮のほか、尿細管間質病変（尿細管拡張・好塩基性化、間質性線維の増殖・線維化、単核炎症性細胞浸潤）の発現頻度及び程度の増加、糸球体及び尿細管間質の pSmad2 及び aSMA 免疫染色の増加も認められた。

UUL モデルでは、偽手術群の腎臓及び尿管結紮の対側腎臓の被験物質に関連した糸球体の変化は、5/6 腎摘出モデルの偽手術群にみられた被験物質に関連した変化と同様であった。尿管結紮による腎臓の組織学的変化は閉塞性腎障害の特徴を示し、媒体対照群と被験物質投与群の間で閉塞性腎障害の程度に顕著な差は認められなかった。

以上より、5/6 腎摘出モデルに luspatercept 又は RAP-536 を Q2W 皮下投与した結果、糸球体及び尿細管間質性の病変の顕著な亢進、pSmad2 及び aSMA 免疫染色の増加並びに尿中アルブミン、TIM-1 及び osteopontin の増加が、媒体投与群及び偽手術群と比較して認められた。

9 考察及び結論

Luspatercept の毒性について、GLP に準拠した反復投与毒性試験（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）により評価した。さらに、luspatercept の腎毒性についてラットを用いた探索的腎毒性試験（GLP 非適用）を実施して評価した。

ラットの一般毒性試験、幼若動物毒性試験及び胚・胎児発生に関する試験では、 luspatercept に対する ADA の産生が検出された。ADA の発現率は、ラット 3 ヵ月間投与試験（63.8%）を除いて低く、ラット 3 ヵ月間試験では高力価抗体の存在により luspatercept の血清中濃度が低下したが、他の試験では TK への影響はみられなかった。サル 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間投与試験では ADA の発現率は低く、サル 3 ヵ月間投与試験で検出された低抗体価の ADA による TK への影響はみられなかったが、6 ヵ月間投与試験の ADA 陽性 1 例で Day 183 以降の TK 値に影響が認められた。また、胚・胎児発生に関する試験でも ADA がウサギの数例に検出され、母動物及び胎児の luspatercept 濃度が低下した。

反復投与毒性試験で luspatercept に関連した変化が認められた器官・組織は、心臓及び肺（組織学的変化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）、脳脈絡叢（サルのみ）、胸腺（ラット及びサル）であった。

血液学的所見［赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）の増加］が全試験で共通して認められた。赤血球パラメータの増加に関連して網状赤血球数及び RDW の増加、MCH 及び MCV の減少が認められた。赤血球パラメータの増加は luspatercept 投与で望まれる薬理作用であり、貧血に関連する病態に対する治療介入の目標作用である。また、下顎及び腋窩リンパ節

Approved v2.0

の髄外造血がサル 6 ヵ月間投与試験のすべての用量で認められた。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、雄では回復期間終了時にも持続した。サル 3 ヵ月間投与試験では、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及びサルで認められた。認められた用量はラットでは 1 ヵ月間投与試験で 6 mg/kg 以上、3 ヵ月間試験で 1 mg/kg 以上、サルでは 3 ヵ月間及び 6 ヵ月間試験で 1 mg/kg 以上（いずれも Q2W 投与）であり、本所見に関する NOAEL はヒトに臨床用量 1.75 mg/kg Q3W を投与したときの曝露量よりも低い曝露量に相当した。サルでは、さらに尿細管及び間質への影響（間質及び尿細管の出血、間質の線維化、尿細管の変性・萎縮など）がみられ、高用量（3 ヵ月間試験で 30 mg/kg、6 ヵ月間試験で 6 mg/kg）で最も顕著であった。腎臓の所見と関連して、BUN 及びクレアチニンの軽微な増加が認められた。さらに、ラット 1 ヵ月間投与試験で 60 mg/kg で雌にカリウム及び無機リンの増加、サル 6 ヵ月間投与試験で尿中アルブミン／クレアチニン比の上昇も認められた。サル 1 ヵ月間投与試験では腎臓の病理組織学的変化は認められなかったが、検討した最高用量の 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。多くの反復投与試験では、2 ヵ月間又は 10 週間の回復期間後も糸球体病変が認められた。サル 6 ヵ月間投与試験では、1 mg/kg で認められた腎臓の変化は 12 週間の回復期間後に概して回復したが、6 mg/kg で認められた変化は回復期間後も認められた。

腎障害の進行に対する luspatercept の作用を詳細に検討するため、13 週間投与腎毒性試験（非 GLP）を実施した。本試験では、2 種類のげっ歯類腎障害モデルである 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）又はそのマウス相同蛋白である RAP-536（10 mg/kg Q2W）を投与した。5/6 腎摘出モデルに luspatercept 又は RAP-536 を皮下投与した結果、媒体投与群及び偽手術群と比較して、糸球体及び尿細管間質の病変の顕著な亢進、 pSmad2 及び aSMA 免疫染色の増加並びに尿中アルブミン、TIM-1 及びオステオポンチンの増加が認められた。UUL モデルでは、閉塞性腎障害の程度に媒体投与群と luspatercept 及び RAP-536 投与群との間で顕著な差は認められなかった。本試験では複数時点での TK を測定しなかったものの、luspatercept 低用量（0.5 mg/kg）での曝露量は臨床用量におけるヒト曝露量より低いと推測された。

腎臓組織の免疫組織化学検査をラット 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 投与群について実施した結果、変化がみられた個体のほとんどで糸球体の病変部に免疫成分の沈着（膜内及びメサンギウム領域の IgG、IgM 若しくは 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、このような陽性反応は糸球体損傷の二次的変化としても生じる。また、サル及びラットにおいて腎臓の所見と血清中の ADA の存在との間に関連性はみられなかった。これらのことから、腎臓所見への免疫複合

Approved v2.0

体沈着の関与は除外できないものの、luspatercept の直接的な影響であると推定された。したがって、臨床試験では腎臓の機能及び状態を注意深くモニタリングしており、ヒト被験者において腎障害と 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、1 mg/kg 以上の用量で脈絡叢の血管を含む間質に luspatercept 投与に関連した所見がみられ、病理組織学的検査で血管変性、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により、luspatercept 投与群の半数に脈絡叢の変化を伴う脈絡叢間質の C3 顆粒の増加が認められた。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。12 週間の回復期間終了時、脈絡叢の所見は 6 mg/kg 群の雄 1 例にわずかに認められたのみで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唆する所見は認められず、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、カニクイザルで通常みられる自然発生性変化[3]と一致し、脈絡叢の機能への影響はないと考えられ[4]、中枢神経性の臨床症状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。脈絡叢の所見は 6 ヵ月間投与後の 12 週間の回復期間終了時までに回復した。本所見のヒトにおけるリスクを評価するバイオマーカーは存在せず、中枢神経性臨床症状のモニタリングを実施した。第 3 相臨床試験（ACE536-MDS-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半で 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、2.1.2.2 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。

ラットのみに発現した所見は、副腎、肝臓及び胃に認められた。副腎では、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（1 ヵ月間投与で 6 mg/kg 以上、3 ヵ月間投与で 1 mg/kg 以上）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。副腎の所見の程度は若齢ラット（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、本所見は副腎の成長や発達に依存しないことが示唆された。

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高く、概して 20 mg/kg 以上で AST、ALT 及び ALP が増加した。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。ラット 3 ヵ月間投与試験では、軽微～軽度の小葉中間帯肝細胞の空胞化が認められ、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した変化は認められなかった。この壊死所見は対照群と luspatercept 投与群で質的に同様であり、luspatercept 投与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

胃腺部の粘膜固有層に軽微～軽度の鉱質沈着が 6 mg/kg 以上を 1 ヵ月間投与した雌雄ラットで認められた。胃の多巣性鉱質沈着は、2 ヵ月間の回復期間後も雄で全用量、雌では 20 mg/kg 以上で持続した。これらの胃の所見は、3 ヵ月間試験（1、3 及び 15 mg/kg）では認められなかった。

心臓及び肺の重量減少は、1 ヵ月間試験で 6 mg/kg 以上、3 ヵ月間試験では 3 mg/kg 以上で認められた。さらに前立腺重量の減少が 15 mg/kg を 3 ヵ月間投与した若齢雄で認められた。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。

胚・胎児発生に関する試験（用量設定試験及び最終試験）を妊娠ラット及びウサギを用いて実施した。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、黄体数及び着床数が減少し、胚・胎児発生試験と同様に生存胚数の減少が認められた。着床数及び生存胚数の減少は黄体数の減少による二次的変化と考えられた。Luspatercept を投与した雄を無処置の雌と交配させた結果、交配能、受胎能及び胎児関連指標に影響は認められなかった。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、妊娠・哺育への luspatercept に関連した悪影響はみられなかった。F1 世代では、出生時から哺育期間中、離乳後（生後 28 日）を通して体重減少が雌雄ともに交配前期間まで持続し、雄では交配期間中及び交配後期間を通して持続した。また、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～軽度な尿細管萎縮・形成不全、軽微～軽度の血管拡張及び散発的な出血）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。

SD ラット幼若動物を用いた毒性試験（用量設定試験及び最終試験）を実施した。幼若ラットへの投与は生後 7 日から開始した。成熟ラットの反復投与毒性試験で認められた所見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、胃の粘膜鉱質沈着並びに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 [1] 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。

その他、ラット及びウサギの複数の試験でみられた luspatercept 関連の所見は、後肢・足蹠の腫脹・運動障害であった。本所見は概して数週間の投与後から発現し、一過性で有害所見ではないと考えられた。しかし、幼若ラットの最終試験では 1 mg/kg 以上で認められ、摂餌行動に支障があったため有害所見と考えられ、TK サテライト群の 3 及び 10 mg/kg 群の各 1 例を状態悪化により早期安楽死させた。計画剖検日まで生存した 10 mg/kg 群の雄 1 例では、右後肢の腫脹に関連して、病理組織学的

Approved v2.0

検査で線維化、炎症、軟骨化生及び骨膜骨形成が認められた。本試験以外に後肢の腫脹に関連した組織学的所見は認められなかった。

がん原性の評価については、ICH S6(R1) ガイドラインに記載されているとおり、バイオ医薬品では標準的ながん原性試験は一般的に不適当と考えられ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、大部分の個体で投与 3 ヵ月以降は適切な曝露量の維持が困難であった。これらのことに基づき、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、幼若ラット毒性試験の最終試験（6.2.3 項）で 3 例の血液悪性腫瘍（リンパ腫、骨髄性白血病及びリンパ性白血病が各 1 件）の発生が最高用量（10 mg/kg）のみで認められた。加齢ラットでのリンパ腫及び白血病の発生は多くみられるが、26 週齢未満のラットでこれらの腫瘍が発現することはまれであり、luspatercept 投与との関連性は明らかでない。また、ラット 3 ヵ月間試験（3.1.2 項）で高用量群（15 mg/kg）の雌 1 例が 11 週目に死亡発見され、播種性多形性リンパ腫と診断された。本腫瘍は自然発生性で luspatercept 投与との関連性はないと判断された。幼若ラットでの 10 mg/kg Q2W における曝露量は、臨床用量 1.75 mg/kg Q3W におけるヒト曝露量の 3.1 倍に相当する。

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 ヵ月間反復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 に起因する増殖性病変又は前がん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（luspatercept のマウス相同蛋白）は腫瘍増殖促進作用を示さなかった[5]。幼若ラット試験の腫瘍所見を含むがん原性リスクについては、添付文書に記載し注意喚起する予定である。これまでに luspatercept 投与患者における血液悪性腫瘍のリスク増加は報告されていない【M2.5、5.3.3.1 項】。実施中の臨床試験では悪性腫瘍の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 が結合する主要な TGF-β スーパーファミリーメンバー［増殖分化因子（GDF）11、GDF8、アクチビン B 及び骨形成蛋白（BMP）6］は、多数の組織及び器官系の成長、発生、恒常性、機能に対して多様な影響を及ぼす[6]。このリガンドファミリーが関与する生体内の機能は複雑かつ高度に重複しているため、これらリガンドの作用の攪乱により生じる可能性のある影響を予測することは困難である。しかしながら、luspatercept の非臨床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、BMP 6 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、臨床試験で実施している腎機能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【M2.5、5.3.3.2 項】。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影響が認

Approved v2.0

められたことは、luspatercept のアクチビン 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は、サル 6 ヵ月間投与試験で認められた脈絡叢の軽微で有害で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、赤血球パラメータ（赤血球数、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 が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。

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、幼若動物の毒性試験）で得られた無毒性量及び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 9-1 に示す。ヒト曝露量は、最大臨床用量 1.75 mg/kg Q3W を投与した被験者における定常状態時の 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 9-1: 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 ヵ月間反復投与	1	12.64	3917	0.8	0.6
サル 6 ヵ月間反復投与	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
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

Approved v2.0

[a] ラット 3 ヵ月間反復投与毒性試験及び幼若ラット毒性試験は最小毒性量
[b] 最大臨床用量 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

以上の本概要文に記載した一連の非臨床毒性試験を実施し、luspatercept の非臨床安全性を評価した。各種毒性試験の成績から、luspatercept を MDS に伴う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安全性が確認された。

Approved v2.0

10 参考文献

[1] 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.

[2] Son WC, Gopinath C. Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol 2004;32:371-4.

[3] Butt M, Whitney K, Davis W, Arkella S, Parker S, Foley G. Microscopic background changes in brains of cynomolgus monkeys. Toxicol Pathol 2015;43:513-518.

[4] 20039148 Final Celegene Memo to the Study File (Memo to the Study File TPSDOC00305). Tox Path Specialists, LLC; 2018.

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

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

TABLE OF CONTENTS

1 毒性試験：一覧表 2
2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 4
3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 5
4 毒性試験：使用したロット 8
5 単回投与毒性試験 10
6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 10
7 反復投与毒性試験：重要な試験 11
8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 45
9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 45
10 がん原性試験 45
11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 46
12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 47
13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 52
14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 58
15 生殖発生毒性試験：新生児を用いた試験 63
16 局所刺激性試験 85
17 その他の毒性試験 86

Approved v1.0

1 毒性試験：一覧表

Table 2.6.7.1: Toxicology Overview

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/dose) [a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location in Dossier
Repeat-dose Toxicity	Rat/Sprague Dawley	SC	1 month	0, 6, 20, or 60 (2 doses, Q2W)	Yes	[redacted]	024488	4.2.3.2-1
	Rat/Sprague Dawley	SC	13 weeks	0, 1, 3, or 15 (Q2W)	Yes	[redacted]	20017484	4.2.3.2-2
	Monkey/ Cynomolgus	SC, IV	4 weeks	0, 0.4, 2, 10, or 30 (SC), or 10 (IV) (2 doses, Q2W)	Yes	[redacted]	WHH00067	4.2.3.2-3
	Monkey/ Cynomolgus	SC	13 weeks	0, 1, 6, or 30 (Q2W)	Yes	[redacted]	20017483	4.2.3.2-4
	Monkey/ Cynomolgus	SC	6 months	0, 0.3, 1, or 6 (Q2W)	Yes	[redacted]	20039148	4.2.3.2-5
Reproductive and Developmental Toxicity								
FEED	Rat/Sprague Dawley	SC	M: 4 doses [b] F: 3 doses [b]	0, 1, 3, or 15	Yes	[redacted]	20040551	4.2.3.5.1-1
Female FEED	Rat/Sprague Dawley	SC	Days 1, 15, and 29 [c]	0, 15	Yes	[redacted]	ACE-536-TOX-2734	4.2.3.5.1-2
DRF for EFD	Rat/Sprague Dawley	SC	GD 3 and 10	0, 3, 15, 30, or 60	Yes	[redacted]	20040547	4.2.3.5.2-1
EFD	Rat/Sprague Dawley	SC	GD 3 and 10	0, 5, 15, or 30	Yes	[redacted]	20040548	4.2.3.5.2-2
DRF for EFD	Rabbit/NZW	SC	GD 4 and 11	0, 10, 25, or 40	Yes	[redacted]	20040549	4.2.3.5.2-3

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous; IV = intravenous; Q2W = once every 2 weeks; M = male; F = female; FEED = fertility and early embryonic development; EFD = embryo-fetal development; PPND = pre- and postnatal development; NZW = New Zealand White; DRF = dose range finding; GD = gestation day; PND = postnatal day; UUL = unilateral ureter ligation;

[redacted]

Table 2.6.7.1: Toxicology Overview

Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/dose) [a]	GLP Compliance	Testing Facility	Study No.	Location in Dossier
EFD	Rabbit/NZW	SC	GD 4 and 11	0, 5, 20, or 40	Yes	[redacted]	20040550	4.2.3.5.2-4
PPND	Rat/Sprague Dawley	SC	GD 6 – PND 20	0, 3, 10, or 30	Yes	[redacted]	ACE-536-TOX-2485	4.2.3.5.3-1
Juvenile Toxicity	Rat/Sprague Dawley	SC	PND 7 – PND 56 or PND 21 – PND 70	0, 1, 6, or 15 (Q2W)	Yes	[redacted]	[redacted]-961002	4.2.3.5.4-1
	Rat/Sprague Dawley	SC	PND 7 – PND 91	0, 1, 3, or 10 (Q2W)	Yes	[redacted]	[redacted]-961003	4.2.3.5.4-2
Other Toxicity Studies								
Renal toxicity in 5/6 nephrectomy or UUL models	Rat/Sprague Dawley	SC	13 weeks	Luspatercept at 0.5 or 5 Q2W RAP-536 at 10 Q2W [d]	No	[redacted]	CC-DISC-TOX-2024	4.2.3.7.3-1

[a] Unless otherwise specified, for repeat-dose toxicity, the highest NOAEL (No Observed Adverse-Effect Level) is underlined.
[b] Males: once every other week beginning 28 days prior to cohabitation;.Females: Day 1, Day 15 before cohabitation, and on GD 3.
[c] On GD 6, GD 20 and 14 days following the GD 20 dose.
[d] RAP-536 is the murine ortholog of luspatercept, with an identical extracellular binding domain, but the Fc portion is murine IgG2a rather than human IgG1.

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous; IV = intravenous; Q2W = once every 2 weeks; M = male; F = female; FEED = fertility and early embryonic development; EFD = embryo-fetal development; PPND = pre- and postnatal development; NZW = New Zealand White; DRF = dose range finding; GD = gestation day; PND = postnatal day; UUL = unilateral ureter ligation;

[redacted]

Approved v1.0

2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Table 2.6.7.2: Toxicokinetics **Overviwe of Toxicokinetics Studies**

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/dose)	GLP Compliance	Study No.
1-Month Toxicity study	Rat/ Sprague Dawley	SC	0, 6, 20, or 60 (2 doses, Q2W)	Yes	024488
13-Week Toxicity study	Rat/ Sprague Dawley	SC	0, 1, 3, or 15 (Q2W)	Yes	20017484
4-Week Toxicity study	Monkey/ Cynomolgus	SC and IV	10 (IV) or 0, 0.4, 2, 10, or 30 (SC) (2 doses, Q2W)	Yes	WHH00067
13-Week Toxicity study	Monkey/ Cynomolgus	SC	0, 1, 6, or 30 (Q2W)	Yes	20017483
6-Month Toxicity study	Monkey/ Cynomolgus	SC	0, 0.3, 1, or 6 (Q2W)	Yes	20039148
DRF study for EFD	Rat/ Sprague Dawley	SC	0, 3, 15, 30, or 60 on GD 3 and 10	Yes	20040547
EFD (definitive) study	Rat/ Sprague Dawley	SC	0, 5, 15, or 30 on GD 3 and 10	Yes	20040548
DRF study for EFD	Rabbit/ NZW	SC	0, 10, 25, or 40 on GD 4 and 11	Yes	20040549
EFD (definitive) study	Rabbit/ NZW	SC	0, 5, 20, or 40 on GD 4 and 11	Yes	20040550
PPND study	Rat/ Sprague Dawley	SC	0, 3, 10, or 30 on GD 6, GD 20 and 14 days following the GD 20 dose	Yes	ACE-536-TOX-2485
Juvenile DRF study	Rat/ Sprague Dawley	SC	0, 1, 6, or 15 (Q2W); PND 7 through 56 or PND 21 through 70	Yes	[redacted]-961002
Juvenile (definitive) study	Rat/ Sprague Dawley	SC	0, 1, 3, or 10 (Q2W); PND 7 through 91	Yes	[redacted]-961003

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; SC = subcutaneous; IV = intravenous; Q2W = once every 2 weeks; EFD = embryo-fetal development; PPND = pre- and postnatal development; NZW = New Zealand White; DRF = dose range finding; GD = gestation day; PND = postnatal day.

Approved v1.0

3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Table 2.6.7.3: Toxicokinetics Overviwe of Toxicokinetics Data

Dose (mg/kg/dose) and frequency	Study Duration (Study No.)	Sample Collection	Steady-State AUC(0-336h) (µg·h/mL)					Human [d]
			Rat		Monkey		Rabbit (pregnant)	
			Male	Female	Male	Female		
0.3 (Q2W)	6 months (20039148)	Day 183			1219	1240		
0.4 (SC Q2W) [a]	4 weeks (WHH00067)	Day 15			978.3	965.3		
1 (Q2W)	13 weeks (20017484)	Day 85	5952	2262				
1 (Q2W)	13 weeks (20017483)	Day 85			5822	5392		
1 (Q2W)	6 months (20039148)	Day 183			3694	5130		
1 (Q2W from PND 7 through 56)	3 months ([redacted]-961002)	PND 49	2415	2370				
1 (Q2W from PND 21 through 70)	3 months ([redacted]-961002)	PND 63	2795	1956				
1 (Q2W from PND 7 through 91)	3 months ([redacted]-961003)	PND 91	2883	2388				
1.75 (Q3W)								6468
2 (SC Q2W) [a]	4 weeks (WHH00067)	Day 15			5775	5904		
3 (Q2W)	13 weeks (20017484)	Day 85	10291	3622				
3 (GD 3 and 10) [b,c]	21 days (20040547)	GD 10		3618				
3 (Q2W from PND 7 through 91)	3 months ([redacted]-961003)	PND 91	9108	7864				
5 (GD 3 and 10) [b,c]	21 days (20040548)	GD 10		6166				
5 (GD 4 and 11) [b,c]	29 days (20040550)	GD 11					12420	
6 (Q2W)	1 month (024488)	Day 15	15792	17070				
6 (Q2W)	13 weeks (20017483)	Day 85			67156	39741		

Abbreviations: AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Q2W = once every 2 weeks; Q3W = once every 3 weeks; IV = intravenous; SC = subcutaneous; GD = gestation day; PND = postnatal day.

Approved v1.0

Table 2.6.7.3: Toxicokinetics Overviwe of Toxicokinetics Data

Dose (mg/kg/dose) and frequency	Study Duration (Study No.)	Sample Collection	Steady-State AUC(0-336h) (µg·h/mL)					Human [d]
			Rat		Monkey		Rabbit (pregnant)	
			Male	Female	Male	Female		
6 (Q2W)	6 months (20039148)	Day 183			22525	20729		
6 (Q2W from PND 7 through 56)	3 months ([redacted]-961002)	PND 49	13543	15096				
6 (Q2W from PND 21 through 70)	3 months ([redacted]-961002)	PND 63	15845	17317				
10 (SC Q2W) [a]	4 weeks (WHH00067)	Day 15			27562	27408		
10 (IV Q2W) [a]	4 weeks (WHH00067)	Day 15			26310	27132		
10 (GD 4 and 11) [b,c]	29 days (20040549)	GD 11					18771	
10 (Q2W from PND 7 through 91)	3 months ([redacted]-961003)	PND 91	22142	17966				
15 (Q2W)	13 weeks (20017484) (mature)	Day 85	38145	23071				
15 (Q2W)	13 weeks (20017484) (young)	Day 85	61777	25830				
15 (GD 3 and 10) [b,c]	21 days (20040547)	GD 10		14538				
15 (GD 3 and 10) [b,c]	21 days (20040548)	GD 10		16128				
15 (Q2W from PND 7 through 56)	3 months ([redacted]-961002)	PND 49	23896	30553				
15 (Q2W from PND 21 through 70)	3 months ([redacted]-961002)	PND 63	32369	35310				
20 (Q2W)	1 month (024488)	Day 15	54551	48722				
20 (GD 4 and 11) [b,c]	29 days (20040550)	GD 11					36314	
25 (GD 4 and 11) [b,c]	29 days (20040549)	GD 11					43327	

Abbreviations: AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Q2W = once every 2 weeks; Q3W = once every 3 weeks; IV = intravenous; SC = subcutaneous; GD = gestation day; PND = postnatal day.

Approved v1.0

Table 2.6.7.3: Toxicokinetics Overviwe of Toxicokinetics Data

Dose (mg/kg/dose) and frequency	Study Duration (Study No.)	Sample Collection	Steady-State AUC(0-336h) (µg·h/mL)					Human [d]
			Rat		Monkey		Rabbit (pregnant)	
			Male	Female	Male	Female		
30 (SC Q2W) [a]	4 weeks (WHH00067)	Day 15			85687	77778		
30 (Q2W)	13 weeks (20017483)	Day 85			126311	132759		
30 (GD 3 and 10) [b,c]	21 days (20040547)	GD 10		26428				
30 (GD 3 and 10) [b,c]	21 days (20040548)	GD 10		34488				
40 (GD 4 and 11) [b,c]	29 days (20040549)	GD 11					59955	
40 (GD 4 and 11) [b,c]	29 days (20040550)	GD 11					75690	
60 (Q2W)	1 month (024488)	Day 15	87770	104260				
60 (GD 3 and 10) [b,c]	21 days (20040547)	GD 10		49412				

[a] AUC(0-240h) is presented for subcutaneous dose groups and AUC(0-144h) is presented for the 10 mg/kg intravenous dose group in Study WHH00067.
[b] Pregnant females.
[c] AUC(0-168h) is presented for Study 200040547, Study 20040548, Study 20040549, and Study 20040550.
[d] Human exposure is based on the estimates of AUC(0-504h) (6468 µg•h/mL) for the highest clinical dose of 1.75 mg/kg Q3W (extrapolated from AUC(0-21d) [154 day•µg/mL at 1 mg/kg Q3W]) in adult human subjects (Pharmacometric Report ACE-536-MPK-008).

Abbreviations: AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Q2W = once every 2 weeks; Q3W = once every 3 weeks; IV = intravenous; SC = subcutaneous; GD = gestation day; PND = postnatal day.

Approved v1.0

4 毒性試験：使用したロット

Table2.6.7.4: Toxicology Drug Substance

Batch No.	Size Exclusion Chromatography ≥ 98.0% monomer	Specified Impurities		Study No.	Type of Study
		Bioburden ≤ 1 CFU/10 mL	Endotoxin ≤ 15.0 EU/mL		
P09536-001-X	100%	NT	< 0.002	024488	1-month repeat-dose SC study in rats
P09536-002-X	100%	NT	0.0003	WHH00067	4-week repeat-dose SC/IV study in monkeys
P09536-006-X	100%	< 2	0.002	20017484	13-week SC study in mature and young adult rats
				20017483	13-week repeat-dose SC study in monkeys
DS13536-003-X	100%	0	0.022	20040547	DRF EFD study in rats
				20039148	6-month SC study in monkeys
				20040547	DRF EFD study in rats
				20040548	EFD study in rats
				20040549	DRF EFD study in rabbits
				20040550	EFD study in rabbits
				20040551	FEED study in rats
				[redacted]-961002	Repeat-dose DRF juvenile study in rats
				[redacted]-961003	Repeat-dose juvenile study in rats
				CC-DISC-TOX-2024 [a]	Renal investigative study in rats

Abbreviations: CFU: colony forming unit; EU: endotoxin unit; HMW = high molecular weight; LMW = low molecular weight; No. = number; NT = not tested; DRF = dose range finding; IV = intravenous; SC = subcutaneous; EFD = embryo-fetal development; FEED = fertility and early embryonic development; PPND = pre- and postnatal development.

Approved v1.0

Batch No.	Size Exclusion Chromatography			Specified Impurities			Study No.	Type of Study
	≥ 98.0% monomer	% HMW ≤5%	% LMW	Polysorbate-80	Sterility	Endotoxins ≤ 0.5 EU/mg		
16P1105 [b]	99%	0%	1%	0.0209%	Meets requirements	Meets requirements	ACE-536-TOX-2485	PPND study in rats
							ACE-536-TOX-2734	Female FEED study, and assessment of recovery in rats

[a] This study contained additional test articles, other than the candidate drug. Batch analysis data for these test articles are available in the study report (Report CC-DISC-TOX-2024).

[b] This drug product batch was a mixture of drug substance lots 485544 and 521871. Further batch analysis information is presented in Module 3,Section 3.2.S.4.4 Batch Analysis and Section 3.2.P.5.4 Batch Analysis.

Abbreviations: CFU: colony forming unit; EU: endotoxin unit; HMW = high molecular weight; LMW = low molecular weight; No. = number; NT = not tested; DRF = dose range finding; IV = intravenous; SC = subcutaneous; EFD = embryo-fetal development; FEED = fertility and early embryonic development; PPND = pre- and postnatal development.

Approved v1.0

5 単回投与毒性試験

該当なし。

6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

該当なし。

Approved v1.0

7 反復投与毒性試験：重要な試験

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats

Report Title: ACE-536: A One-month Subcutaneous Toxicity Study with a Two-month Recovery Period in Rats

Test Article: Luspatercept

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley

Duration of Dosing: 1 month (2 doses, Q2W)

Study No.: 024488

Initial Age: 7 weeks

Duration of Postdose: 2 months

Location in Dossier: 4.2.3.2-1

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Subcutaneous injection

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

GLP Compliance: Yes

Special Features: ADA specificity (Report TR245; an in vitro investigational study)

No Observed Adverse Effect Level: < 6 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**6**		**20**		**60**	
Number of Animals		**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Toxicokinetics:	No. evaluated	0	0	12	12	12	12	12	12
Day 1	Cmax (µg/mL)	NA	NA	53.2	57.5	167.2	212.9	425.0	502.5
	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	NA	NA	10791	12462	34811	39342	76906	91810
Day 15	Cmax (µg/mL)	NA	NA	87.8	99.7	249.9	301.2	489.3	727.1
	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	NA	NA	15792	17070	54551	48722	87770	104260
ADA analysis [a]		NT	NT	1/9	3/9	1/9	2/9	4/9	1/9
Noteworthy findings									
No. evaluated		10	10	10	10	10	10	10	10
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight (%) (Day 28) [b]		379 g	-	-	-	−4.2	-	−7.1**	-
Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 024488

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**6**		**20**		**60**	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Hematology (Day 29)								
Red blood cells (10^6/µL)	8.21	8.33	9.26*	9.30*	9.41**	9.68**	10.29**	10.26**
Hemoglobin (g/dL)	15.7	15.6	17.1*	-	17.2*	17.4**	18.1**	18.3**
Hematocrit (%)	48.0	45.5	-	-	-	51.3**	55.7**	55.0**
Mean corpuscular volume (fL)	58.5	54.6	-	52.3**	-	53.1*	54.1**	-
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	19.2	18.7	18.4*	18.0*	18.3**	18.0*	17.6**	17.9**
Red cell distribution width (%)	12.6	11.8	-	-	13.7**	-	14.7**	13.3**
Platelets (10^3/µL)	1131	1095	929*	-	941*	-	849**	891**
Mean platelet volume (fL)	8.39	8.70	-	-	-	-	9.89**	9.65**
White blood cells (10^3/µL)	-	6.21	-	-	-	8.77*	-	9.74**
Lymphocytes (10^3/µL)	-	4.81	-	-	-	7.32**	-	7.80**
Monocytes (10^3/µL)	0.19	0.111	-	-	-	-	0.435*	0.261**
Basophils (10^3/µL)	-	0.013	-	-	-	-	-	0.036**
Serum chemistry (Day 29)								
Potassium (mmol/L)	-	5.54	-	-	-	-	-	6.05**
Phosphorus (mg/dL)	-	8.96	-	-	-	-	-	10.70**
Blood urea nitrogen (mg/dL)	13.3	17.3	-	-	-	-	18.7**	22.7**
Creatinine (mg/dL)	-	0.68	-	-	-	-	-	0.82*
Alanine aminotransferase (U/L)	28.0	26.0	36.8*	-	37.4*	-	38.5**	49.4*
Aspartate aminotransferase (U/L)	67.8	72.5	88.9**	-	86.3**	86.7	96.5**	151.7
Alkaline phosphatase (U/L)	208	121	280*	-	309**	-	310**	225**

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 024488

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**6**		**20**		**60**	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Creatinine kinase (U/L)	-	192	-	-	-	-	-	308*
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology								
Adrenal glands:								
Discolored areas, black/yellow	-	0	-	-	-	-	-	2
Thymus:								
Discoloration, red, all lobes	0	0	-	-	1	-	1	2
Discolored area(s), red, all lobes	0	0	-	-	1	-	2	2
Discolored area(s), red, all, lobes, pinpoint	0	0	-	-	-	1	1	-
Organ weights (%) [b]								
Heart:								
Absolute	1.40 g	0.86 g	−22**	−14**	−27**	−16**	−32**	−12**
Relative to body weight	3.907 g/kg	4.034 g/kg	−18.5**	−17.5**	−23.6**	−17.8**	−23.5**	−17.2**
Relative to brain weight	0.7401 g/g	0.4766 g/g	−23.5**	−14.8**	−28.5**	−14.7**	−33.0**	−13.6**
Lungs:								
Absolute	2.35 g	1.46 g	−24**	−9	−26**	−11	−28**	−14*
Relative to body weight	6.55 g/kg	6.88 g/kg	−20.2*	−13.1*	−22.1**	−13.2*	−20.2*	−19.3**
Relative to brain weight	1.2412 g/g	0.8150 g/g	−25.0**	−10.1	−27.5**	−10.4	−29.7**	−16.0**
Histopathology								
Adrenal glands:								
Congestion, zona fasciculata, unilateral, diffuse								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 024488

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Mild	-	0	-	-	-	1	-	-
Congestion, zona fasciculata, bilateral, diffuse								
Minimal	0	0	-	1	-	1	1	4
Mild	0	0	-	1	-	3	3	3
Necrosis, coagulative, zona fasciculata, unilateral locally extensive								
Mild	-	0	-	1	-	-	-	-
Marked	-	0	-	-	-	1	-	-
Necrosis, coagulative, zona fasciculata, bilateral, locally extensive								
Marked	-	0	-	-	-	-	-	3
Mineralization, zona fasciculata, unilateral, locally extensive								
Mild	-	0	-	1	-	-	-	-
Marked	-	0	-	-	-	1	-	-
Mineralization, zona fasciculata, bilateral, locally extensive								
Marked	-	0	-	-	-	-	-	3
Kidney:								
Chronic progressive nephropathy								
Minimal	5	4	8	-	10	-	9	7
Membranoproliferative glomerulonephritis, bilateral multifocal								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 024488

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Minimal	0	0	10	9	-	-	-	-
Mild	0	0	-	-	10	10	-	-
Membranoproliferative glomerulonephritis, bilateral diffuse								
Mild	0	0	-	-	-	-	10	10
Liver:								
Necrosis, coagulative, hepatocellular, single cell, multifocal								
Minimal	0	0	5	7	9	7	-	-
Necrosis, coagulative, hepatocellular, single cell, diffuse								
Minimal	0	0	-	-	-	-	10	6
Necrosis, coagulative, hepatocellular, locally extensive								
Mild	-	0	-	1	-	2	-	2
Vacuolation, increased, hepatocellular, idzonal, diffuse								
Minimal	0	0	-	6	10	10	-	-
Mild	0	0	-	-	-	-	2	3
Stomach:								
Mineralization, lamina propria, glandular, focal								
Minimal	1	0	4	2	-	-	-	1
Mineralization, lamina propria, glandular, multifocal								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 024488

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**6**		**20**		**60**	
Number of Animals		**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Minimal		0	0	5	2	9	6	7	7
Mild		0	-	-	-	1	-	3	-
Thymus:									
Congestion, focal									
Minimal		3	0	2	-	2	1	-	-
Congestion, multifocal									
Minimal		1	2	3	3	5	5	7	10
Postdose evaluation:	No. evaluated	5	5	5	5	5	5	5	5
Serum chemistry (Day 92)									
Phosphorus (mg/dL)		-	7.92	-	-	-	-	-	9.42*
Alkaline phosphatase (U/L)		-	55.4	-	-	-	-	-	85.8*
Gross pathology									
Thymus:									
Discolored areas, red, pinpoint		0	-	-	-	-	-	2	-
Histopathology									
Adrenal glands:									
Necrosis, coagulative, zona fasciculata, bilateral, locally extensive									
Moderate		-	0	-	-	-	1	-	1
Mineralization, zona fasciculata, unilateral, locally extensive									
Moderate		-	0	-	-	-	1	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 024488

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		6		20		60	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Mineralization, zona fasciculata, bilateral, locally extensive								
Moderate	-	0	-	-	-	-	-	1
Kidney:								
Chronic progressive nephropathy								
Minimal	-	1	-	-	-	3	-	3
Membranoproliferative glomerulonephritis, bilateral, multifocal								
Minimal	0	0	4	-	-	3	-	-
Mild	0	-	-	-	5	-	-	-
Membranoproliferative glomerulonephritis, bilateral, diffuse								
Mild	0	0	-	-	-	-	5	5
Liver:								
Necrosis, coagulative, hepatocellular, single cell, multifocal								
Minimal	1	-	-	-	-	-	4	-
Necrosis, coagulative, hepatocellular, locally extensive								
Moderate	0	-	-	-	-	-	1	-
Inflammation, granulomatous, multifocal								
Minimal	0	-	-	-	-	-	4	-
Mild	1	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7A: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 024488

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**6**		**20**		**60**	
Number of Animals	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
Stomach:								
Mineralization, lamina propria, glandular, focal								
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	3
Mineralization, lamina propria, glandular, multifocal								
Minimal	0	0	3	-	3	1	5	1
Thymus:								
Congestion, multifocal								
Minimal	1	-	-	-	3	-	4	-
Moderate	0	-	-	-	-	-	1	-

[a] No. positive animals post-dose/total no. evaluated. Selected ADA-positive samples from rats were analysed and were shown to be specific for epitopes on the human IgG1 Fc region of luspatercept. No specific activity to the ligand binding region of the molecule was detected. (Source: an in vitro, investigational study of ADA specificity [Report TR245]).

[b] For controls, group means are presented. For treated animals, the percent difference from controls is shown. Statistical analyses are based on actual data, not percent difference.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats

Report Title: A 13-week (q2wk x 7) Study of ACE-536 Administered by Subcutaneous Injection in Mature Adult and Young Adult Sprague Dawley Rats with a 10-week Recovery Period

Test Article: Luspatercept

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley

Duration of Dosing: 13 weeks (Q2W)

Study No.: 20017484

Initial Age: ~17 weeks (Mature) ~8 weeks (Young)

Duration of Postdose: 10 weels

Location in Dossier: 4.2.3.2-2

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Subcutaneous injection

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

GLP Compliance: Yes

Special Features: Immunohistochemistry on the kidney sections, Sorbitol dehydrogenase (SDH) analysis, RNA expression analysis

No Observed Adverse Effect Level: < 1 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**15**	
Number of Animals	**(Mature)**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**
	(Young)	**M: 15**	**F: 15**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 15**	**F: 15**
Toxicokinetics:									
Day 1	No. evaluated (Mature)[a]	6	6	5	6	6	6	6	6
Cmax (µg/mL)		NA	NA	7.38	10.16	22.81	19.52	96.22	77.01
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	1677.64	1663.25	4464.30	3624.40	20380.04	12939.12
Day 85	No. evaluated (Mature)[a]	6	6	1	2	3	6	5	4
Cmax (µg/mL)		NA	NA	12.64	8.20	27.12	17.99	102.68	96.27
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	5951.81	2262.48	10290.75	3622.41	38145.37	23071.29
Day 1	No. evaluated (Young)	6	6	NA	NA	NA	NA	6	6
Cmax (µg/mL)		NA	NA	NA	NA	NA	NA	131.85	147.99
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	NA	NA	NA	NA	24780.89	26225.66
Day 85	No. evaluated (Young)[a]	6	6	NA	NA	NA	NA	3	4
Cmax (µg/mL)		NA	NA	NA	NA	NA	NA	168.38	119.11
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	NA	NA	NA	NA	61777.04	25829.56

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**15**	
Number of Animals (Mature/ Young)		**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
ADA analysis [a]	Mature	NT	NT	4/5	4/6	3/6	3/6	4/6	4/6
	Young	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5/6	3/6
Noteworthy findings									
No. evaluated	Mature	10	10	10	10	10	10	10	10
	Young	10	10	NA	NA	NA	NA	10	10
No. died or sacrificed moribund [b]	Mature	0	1	0	0	0	0	0	1
	Young	0	2	NA	NA	NA	NA	0	3
Clinical observations (Mature/Young)		-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight (%) (Mature/Young)		-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (Mature/Young)		-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology (Mature/Young)		-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (Mature) (Day 93)									
Red blood cells (10^6/μL)		9.873	8.651	-	-	11.137*	9.262	12.105*	10.292*
Hemoglobin (g/dL)		16.93	15.63	-	-	18.06*	16.59*	19.24*	17.47*
Hematocrit (%)		54.62	48.21	-	-	58.87*	51.62*	63.91*	55.76*
Reticulocytes (10^5/μL)		1.895	1.410	-	-	2.001	1.603	2.104	2.049*
MCV (fL)		55.39	55.73	-	-	52.96*	55.79	53.08*	54.32
MCHC (g/dL)		31.01	32.41	-	-	-	-	30.12	31.39*
MCH (pg)		17.17	18.06	-	-	16.26*	17.94	15.99*	17.06*
Red cell distribution width (%)		13.57	12.09	-	-	-	13.06*	14.54*	14.14*

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		3		15	
Number of Animals (Mature/ Young)	**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
Platelet Count (10^3/μL)	928.8	-	-	-	-	-	637.5*	-
Hematology (Young) (Day 93)								
Red blood cells (10^6/μL)	9.571	8.535	NA	NA	NA	NA	11.837*	11.498*
Hemoglobin (g/dL)	16.98	15.83	NA	NA	NA	NA	19.01*	19.27*
Hematocrit (%)	54.76	48.52	NA	NA	NA	NA	62.87*	61.88*
Reticulocytes (10^5/μL)	2.158	1.987	NA	NA	NA	NA	2.097	2.186
MCV (fL)	57.24	56.88	NA	NA	NA	NA	53.44*	53.92*
MCHC (g/dL)	31.03	32.63	NA	NA	NA	NA	30.32*	31.18*
MCH (pg)	17.78	18.57	NA	NA	NA	NA	16.23*	16.79*
Red cell distribution width (%)	13.66	12.50	NA	NA	NA	NA	14.50*	14.53*
Platelet count (10^3/μL)	871.2	936.2	NA	NA	NA	NA	667.7*	552.3*
White blood cells (10^3/μL)	8.28	4.95	NA	NA	NA	NA	10.24*	7.80*
Lymphocytes (/μL)	6524.3	3932.0	NA	NA	NA	NA	8420.8*	5986.2*
Monocytes (/μL)	186	96.2	NA	NA	NA	NA	236.7	190.3*
Basophils (/μL)	25.1	10.6	NA	NA	NA	NA	45.1*	28.0*
Coagulation (Mature/Young) (Day 93)	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum chemistry (Mature) (Day 93)								
Blood urea nitrogen (mg/dL)	14.3	15.4	-	-	-	-	17.1*	21.0*
Glucose (mg/dL)	90.8	-	-	-	-	-	78.2*	-
Serum chemistry (Young) (Day 93)								
Blood urea nitrogen (mg/dL)	13.9	14.2	NA	NA	NA	NA	16.3*	20.8*

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**15**	
Number of Animals (Mature/ Young)	**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
Glucose (mg/dL)	93.3	91.5	NA	NA	NA	NA	76.0*	65.4*
Alkaline phosphatase (U/L)	99.7	43.6	NA	NA	NA	NA	128.2*	76.0*
Urinalysis (Mature/Young) (Day 93)	-	-	-	-	-	-	-	-
RNA expression analysis [c]	-	-	-	-	-	-	-	-
Postmortem evaluation								
No. evaluated (Mature)	10	10	10	10	10	10	10	9
No. evaluated (Young)	10	8	NA	NA	NA	NA	10	8
Gross pathology (Mature/Young)	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights (%) (Mature)[d]								
Liver								
Absolute	15.3291 g	8.1605 g	-	-	−9.61	-	−9.49	−11.88
Relative to body weight	0.02406 g/g	0.02291 g/g	-	-	−11.18*	-	−13.18*	−10.48*
Relative to brain weight	6.59464 g/g	3.85270 g/g	-	-	−7.50	-	−10.02	−12.47
Heart								
Absolute	1.7384 g	1.0604 g	-	-	−14.54*	−9.82	−21.68*	−16.39*
Relative to body weight	0.00277 g/g	0.00300 g/g	-	-	−16.97*	−11.00*	−26.35*	−16.00*
Relative to brain weight	0.75291 g/g	0.50186 g/g	-	-	−13.19	−9.18	−22.73*	−17.01*
Kidney								
Absolute	3.3537 g	-	-	-	−10.29*	-	−9.38	-
Relative to body weight	0.00527 g/g	-	-	-	−11.76*	-	−13.09*	-
Relative to brain weight	1.44373 g/g	-	-	-	−8.18	-	−10.01*	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		3		15	
Number of Animals (Mature/ Young)	M: 15/15	F: 15/15	M: 10/0	F: 10/0	M: 15/0	F: 15/0	M: 15/15	F: 15/15
Lung								
Absolute	1.9531 g	-	-	-	−10.45*	-	−10.00*	-
Relative to body weight	0.00308 g/g	-	-	-	−12.01*	-	−13.31*	-
Relative to brain weight	0.84134 g/g	-	-	-	−8.46	-	−10.58*	-
Organ weights (%) (Young)[d]								
Liver								
Absolute	12.9670 g	6.75538 g	NA	NA	NA	NA	−11.67	−13.38*
Relative to body weight	0.02394 g/g	0.02348 g/g	NA	NA	NA	NA	−9.82*	−11.16*
Relative to brain weight	5.64352 g/g	3.18538 g/g	NA	NA	NA	NA	−6.93	−9.39
Heart								
Absolute	1.5093 g	0.96550 g	NA	NA	NA	NA	−14.49*	−18.37*
Relative to body weight	0.00281 g/g	0.00338 g/g	NA	NA	NA	NA	−13.17*	−17.16*
Relative to brain weight	0.65638 g/g	0.45486 g/g	NA	NA	NA	NA	−9.88	−14.40*
Kidney								
Absolute	3.0094 g	-	NA	NA	NA	NA	−10.85	-
Relative to body weight	0.00560 g/g	-	NA	NA	NA	NA	−9.29*	-
Relative to brain weight	1.30950 g/g	-	NA	NA	NA	NA	−6.23	-
Prostate								
Absolute	1.4085 g	NA	NA	NA	NA	NA	−31.40*	NA
Relative to body weight	0.00262 g/g	NA	NA	NA	NA	NA	−29.00*	NA
Relative to brain weight	0.61174 g/g	NA	NA	NA	NA	NA	−27.37*	NA

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**15**	
Number of Animals (Mature/ Young)	**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
Adrenal Gland								
Absolute	-	0.05338 g	NA	NA	NA	NA	-	28.57*
Relative to body weight	-	0.00019 g/g	NA	NA	NA	NA	-	31.58*
Relative to brain weight	-	0.02513 g/g	NA	NA	NA	NA	-	34.98*
Histopathology (Mature)								
Adrenal glands								
Congestion, zona fasciculata								
Minimal	0	0	2	7	3	7	4	7
Mild	-	0	-	1	-	1	-	1
Moderate	-	0	-	-	-	1	-	-
Necrosis, zona fasciculata								
Minimal	-	0	-	1	-	2	-	-
Kidney								
Glomerulonephritis, membranoproliferative								
Minimal	0	0	9	6	4	6	5	8
Mild	0	0	-	-	4	-	5	1
Liver								
Vacuolation, mid-zonal								
Minimal	0	0	3	2	-	1	3	3
Mild	0	0	-	-	1	-	-	1

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**15**	
Number of Animals (Mature/ Young)	**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
Necrosis, (focal, multifocal or with inflammation, multifocal)								
Minimal	-	1	-	1	-	1	-	3
Mild	-	0	-	-	-	2	-	-
Histopathology (Young)								
Adrenal glands								
Congestion, zona fasciculata								
Minimal	0	1	NA	NA	NA	NA	1	2
Moderate	-	0	NA	NA	NA	NA	-	1
Marked	-	0	NA	NA	NA	NA	-	1
Necrosis, zona fasciculata								
Minimal	0	-	NA	NA	NA	NA	1	-
Moderate	-	0	NA	NA	NA	NA	-	3
Marked	-	0	NA	NA	NA	NA	-	1
Mineralization, zona fasciculata								
Moderate	-	0	NA	NA	NA	NA	-	3
Kidney								
Glomerulonephritis, membranoproliferative								
Minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	7	7
Mild	0	0	NA	NA	NA	NA	1	1
Liver								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**15**	
Number of Animals (Mature/ Young)		**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
Vacuolation, mid-zonal									
Minimal		-	0	NA	NA	NA	NA	-	2
Mild		-	0	NA	NA	NA	NA	-	2
Necrosis, (focal, multifocal or with inflammation, multifocal)									
Minimal		-	1	NA	NA	NA	NA	-	1
Immunohistochemistry	No. evaluated (Mature)	2	2	2	2	2	2	2	2
	No. evaluated (Young)	2	2	NA	NA	NA	NA	2	2
Kidney: Granular deposits containing activin receptor IIB-stainable material, rat IgG, and/or C3 in glomerulonephritis		0	0	0	0	1	2	4	2
Postdose evaluation									
No. evaluated (Mature)		5	5	NA	NA	5	5	5	5
No. evaluated (Young)		5	5	NA	NA	NA	NA	5	5
Hematology (Mature) (Day 162)									
Red blood cells ($10^6/\mu L$)		-	7.390	NA	NA	-	8.350	-	8.092
Hemoglobin (g/dL)		-	13.45	NA	NA	-	15.22	-	14.82
Hematocrit (%)		-	40.75	NA	NA	-	46.16	-	44.62
Hematology (Young) (Day 162)									
White blood cell count ($10^3/\mu L$)		-	3.90	NA	NA	NA	NA	-	5.43*
Organ Weights (%) (Mature)[d]									
Heart									

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		3		15	
Number of Animals (Mature/ Young)	**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
Absolute	1.79660 g	-	NA	NA	−12.06*	-	−10.61*	-
Relative to body weight	0.00244 g/g	-	NA	NA	−9.84	-	−7.38	-
Relative to brain weight	0.75760 g/g	-	NA	NA	−10.55	-	−9.68	-
Histopathology (Mature)								
Adrenal glands								
Necrosis, zona fasciculata								
Minimal	0	0	NA	NA	-	1	2	-
Kidney								
Glomerulonephritis,membranoproliferative								
Minimal	0	0	NA	NA	3	5	3	2
Mild	0	-	NA	NA	1	-	-	-
Liver								
Vacuolation, mid-zonal								
Minimal	0	-	NA	NA	-	-	2	-
Histopathology (Young)								
Adrenal glands								
Necrosis, zona fasciculata								
Moderate	-	0	NA	NA	NA	NA	-	1
Kidney								
Glomerulonephritis, membranoproliferative								
Minimal	0	0	NA	NA	NA	NA	2	1

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7B: Repeat-dose Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20017484

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**15**	
Number of Animals (Mature/ Young)	**M: 15/15**	**F: 15/15**	**M: 10/0**	**F: 10/0**	**M: 15/0**	**F: 15/0**	**M: 15/15**	**F: 15/15**
Liver								
Vacuolation, mid-zonal								
Mild	-	0	NA	NA	NA	NA	-	1

[a] Six rats/sex were dosed for toxicokinetic evaluation at each dose level. One mature adult toxicokinetic male (No. 2019, 1 mg/kg) was euthanized moribund on Day 8, and was not included in the evaluation. In addition, animals considered to be statistical outliers were excluded from the analysis.

[b] The following animals were euthanized moribund: Female No. 5504 (0 mg/kg) on Day 29, female No. 5610 (0 mg/kg) on Day 65, female No. 6515 (15 mg/kg) on Day 93. The following animals were found dead: Female No. 6504 (15 mg/kg) on Day 29, female No. 4507 (15 mg/kg) on Day 74, female No. 1513 (0 mg/kg) on Day 93, Female No. 6609 (15 mg/kg) on Day 93. Based on either the macroscopic findings or the temporal relationship to blood collection, none of the mortalities were considered to be related to luspatercept administration.

[c] Overall, no consistent effect on expression of any target genes or shift in MHC-α/MHC-β ratio was detected in any of the evaluated treatment groups.

[d] For controls, group means are presented. For treated animals, the percent difference from controls is shown. Statistical analyses are based on actual data, not percent difference.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MHC = major histocompatibility complex; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7C: Repeat-dose Toxicity in Monkeys

Report Title: A 4-week Toxicity, Toxicokinetic and Immunogenicity Study of ACE-536 Administered by Subcutaneous or Intravenous Injection to Cynomolgus Monkeys, with a 10-week Recovery Period

Test Article: Luspatercept

Species/Strain: Cynomolgus monkeys

Duration of Dosing: 4 weeks (Q2W)

Study No.: WHH00067

Initial Age: 2.5 – 3.4 years (M); 2.4 – 4.8 years (F)

Duration of Postdose: 10 weeks

Location in Dossier: 4.2.3.2-3

Date of First Dose [a]**:** [redacted], 20[redacted] (set A); [redacted], 20[redacted] (set B)

Method of Administration: Subcutaneous/intravenous injection

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

GLP Compliance: Yes

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg (SC); 10 mg/kg (IV)

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**0.4**		**2**		**10**		**30**		**10 (IV)**	
Number of Animals (Mature)		**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics [b]:	No. evaluated	5	5	3	3	3	3	5	5	5	5	5	5
Day 1	Cmax (µg/mL)	NA	NA	5.3	5.0	29.5	29.5	134.0	145.0	399.8	408.0	315.8	234.2
	AUC(0-240h) (µg·h/mL)	NA	NA	780.7	795.7	4852.3	5113.3	22732.8	23108.4	67242.2	64420.4	22371.8	19200.6
Day 15	Cmax (µg/mL)	NA	NA	5.7	6.0	33.9	33.9	185.2	178.6	498.2	466.4	367.6	511.6
	AUC(0-240h) (µg·h/mL)	NA	NA	978.3	965.3	5774.7	5904.3	27562.2	27408.2	85687.0	77778.2	26309.6	27132.0
ADA analysis [c]		NT	NT	1/3	0/3	0/3	0/3	1/5	1/5	0/5	2/5	0/5	0/5
No. died or sacrificed moribund [d]		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Noteworthy findings													
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (qualitative)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight (%)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Physiological examinations		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurological examinations		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-240h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to the last measurable timepoint (240 hours postdose); Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; SC = subcutaneous; IV = intravenous; - = no noteworthy findings.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7C: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) **Study No.** WHH00067

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**0.4**		**2**		**10**		**30**		**10 (IV)**	
Number of Animals (Mature)		**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Hematology (Day 28)													
Red blood cell count (10^6/μL)		5.52	5.28	5.61	5.49	5.87	5.60	6.31*	6.17*	6.03	6.18*	6.15	5.89*
Hemoglobin (g/dL)		12.8	12.4	13.2	13.5	13.6	13.4	14.4*	14.2*	13.5	14.2*	14.4*	14.2*
Hematocrit (%)		39.6	38.6	40.0	41.6	41.5	42.8	45.5*	43.3*	42.4	44.5*	44.2*	44.6*
Red cell distribution width (%)		13.2	13.4	-	-	-	-	13.7	14.2	14.5	14.4	14.9*	15.0
Reticulocytes (10^5/μL)		0.82	0.58	-	-	-	1.06*	-	1.35*	2.06*	1.73*	-	1.32*
Serum chemistry (Day 28)													
Blood urea nitrogen (mg/dL)		23.6	25.2	-	-	-	-	-	-	40.0*	43.2*	33.2*	-
Creatinine (mg/dL)		-	0.58	-	-	-	-	-	-	-	0.90*	-	-
Coagulation		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose evaluation	No. evaluated	2	2	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a] For scheduling convenience, animals were divided into sets (also known as replicates). Groups 1-5 were divided into Sets A and B, while all animals in Group 6 (IV dosing) were placed in Set B. The dosing of Sets A and B was stagger-started by one day.

[b] C(0) (extrapolated serum concentration at time 0) and AUC(0-144h) (AUC from 0 to 144 hours postdose) presented for the 10 mg/kg IV group rather than Cmax and AUC(0-240h) as for SC doses.

[c] No. positive post-dose/total no. evaluated. Although one animal (animal no. 5505) tested positive for ADA on Day 71, the sample in this study was a weak positive with a signal only about two times the cut point. Assay variation between the original and current testing (including different analysts and reagents) could account for the difference in results. Evaluation of the specificity of the sample could not be completed. Excludes animals which were positive prestudy

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-240h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to the last measurable timepoint (240 hours postdose); Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; SC = subcutaneous; IV = intravenous; - = no noteworthy findings.

Approved v1.0

(3 of the antibody responses were transient; one female dosed at 30 mg/kg had a response which persisted until the recovery sacrifice). (Source: an in vitro, investigational study of ADA specificity [Report TR245])

[d] Animal exhibited watery feces beginning on Day 61 and had low food consumption on Days 63-67. Administration of fluids on Day 68 was unsuccessful; the animal was considered moribund and subsequently euthanized on Day 68. The clinical findings in this animal were considered not test article-related. Histopathology observations included mild congestion in the adrenal gland, diffuse mucosal inflammation in the colon, focal mucosal degeneration in the stomach (findings were attributed to the animal's moribund condition and were considered unrelated to effects of the test article).

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-240h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to the last measurable timepoint (240 hours postdose); Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; NT = not tested; Q2W = once every 2 weeks; SC = subcutaneous; IV = intravenous; - = no noteworthy findings.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7D: Repeat-dose Toxicity in Monkeys

Report Title: A 13-week (q2wk x 7) Study of ACE-536 by Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with a 10-week Recovery Period

Test Article: Luspatercept

Species/Strain: Cynomolgus Monkey

Duration of Dosing: 13 weeks (Q2W)

Study No.: 20017483

Initial Age: 2.3-3.3 years

Duration of Postdose: 10 weels

Location in Dossier: 4.2.3.2-4

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Subcutaneous injection

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

GLP Compliance: Yes

Special Features: Immunohistochemistry on the kidney sections

No Observed Adverse Effect Level: 1 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals		**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics:	No. evaluated	5	5	3	3	3	3	5	5
Day 1	Cmax (µg/mL)	NA	NA	20.85	19.28	136.71	84.81	397.34	389.02
	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	NA	NA	4548.11	3842.13	26962.72	18791.68	75016.51	74217.01
Day 85	Cmax (µg/mL)	NA	NA	27.04	24.47	381.98	219.57	711.62	681.01
	AUC(0-336h) (µg·h/mL)	NA	NA	5822.13	5391.73	67155.54	39740.69	126311.42	132758.80
ADA analysis [a]		0/5	0/5	0/3	0/3	0/3	0/3	1/5	1/5
Noteworthy findings									
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (qualitative)		-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology		-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; NA = not applicable; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7D: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20017483

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Physiological examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurological examinations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (Day 98)								
Red blood cells (10^6/μL)	5.834	5.778	6.667	-	7.507*	6.943	8.728*	7.452*
Hemoglobin (g/dL)	13.74	13.00	14.67	13.63	15.87*	15.93*	17.38*	15.64*
Hematocrit (%)	44.22	42.70	48.77	45.53	54.73*	54.17*	62.44*	54.38*
Reticulocytes (10^5/μL)	0.812	0.768	1.190	-	1.400*	1.493*	1.580*	1.354*
MCHC (g/dL)	31.02	30.42	-	-	29.00	-	27.92*	28.74*
MCH (pg)	23.56	22.52	-	-	21.27	-	20.04*	21.08
Red cell distribution width (%)	13.06	13.08	-	-	14.70	-	16.32*	15.36*
Red blood cell morphology (blood smear) [b]								
Nucleated red blood cells	0	0	0	0	2	0	1	3
Anisocytosis	0	0	0	1	1	0	4	3
Polychromasia	1	0	0	0	2	1	2	3
Serum chemistry (Day 98)								
Blood urea nitrogen (mg/dL)	25.6	24.8	-	-	36.7	37.7*	43.6*	48.6*
Creatinine (mg/dL)	0.58	0.60	-	-	0.97*	0.93*	0.92*	1.00*
Alkaline phosphatase (U/L)	623.8	431.6	1034.0	-	1010.7	659.0	916.8	601.6
Ferritin (ng/mL)	39.60	30.62	-	-	115.50	-	190.36	102.46
Coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; NA = not applicable; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7D: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20017483

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals		**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Postmortem evaluations	No. evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Gross pathology									
Kidney:									
Discoloration, dark, cortex		0	-	-	-	-	-	2	-
Thin, cortex		0	-	-	-	-	-	1	-
Organ weights (%) [c]									
Thymus:									
Absolute		4.0310 g	3.6437 g	-	−27.3	−31.1	−33.5	−47.7	−39.4
Relative to body weight		1.5953 g/kg	1.4477 g/kg	-	−27.3	−35.5	−29.1	−47.6	−41.7
Relative to brain weight		0.0577 g/g	0.0557 g/g	-	−22.8	−25.0	−28.7	−44.0	−43.8
Histopathology	No. evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Kidney:									
Membranoproliferative glomerulonephritis									
Minimal		0	0	2	1	2	1	2	1
Mild		0	0	-	-	-	2	1	1
Marked		-	0	-	-	-	-	-	1
Hemorrhage, interstitium									
Minimal		0	0	-	-	-	-	1	1
Moderate		0	-	-	-	-	-	2	-
Fibrosis, interstitium									
Minimal		0	-	-	-	-	-	1	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; NA = not applicable; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7D: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20017483

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**6**		**30**	
Number of Animals		**M: 5**	**F: 5**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 5**	**F: 5**
Moderate		0	-	-	-	-	-	1	-
Thymus:									
Involution									
Minimal		0	0	1	-	-	1	-	-
Mild		0	0	2	2	2	2	2	1
Moderate		-	1	-	1	-	-	-	2
Immunohistochemistry	No. evaluated	2	1	0	0	3	3	5	5
Kidney: Granular deposits containing monkey IgG, IgM and/or C3 in glomerulonephritis		0	0	NA	NA	2	2	4	5
Postdose evaluation	No. evaluated	2	2	0	0	0	0	2	2
Histopathology									
Kidney:									
Membranoproliferative glomerulonephritis									
Minimal		0	-	NA	NA	NA	NA	2	-
Mild		-	0	NA	NA	NA	NA	-	1
Moderate		-	0	NA	NA	NA	NA	-	1
Hemorrhage, interstitium									
Minimal		0	-	NA	NA	NA	NA	1	-
Fibrosis, interstitium									
Minimal		0	-	NA	NA	NA	NA	1	-

[a] No. positive animals post-dose/total no. evaluated.

[b] Total No. of animals with findings through all time points in dosing period.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; NA = not applicable; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

[c] For controls, group means are presented. For treated animals, the percent difference from controls is shown. Statistical analyses are based on actual data, not percent difference.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; NA = not applicable; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7E: Repeat-dose Toxicity in Monkeys

Report Title: A 6-month (q2wk x 14) Study of ACE-536 by Subcutaneous Injection in Cynomolgus Monkeys with a 3-month Recovery Period

Test Article: Luspatercept

Species/Strain: Cynomolgus Monkey

Duration of Dosing: 6 months (Q2W)

Study No.: 20039148

Initial Age: 2.3-6.4 years

Duration of Postdose: 3 months

Location in Dossier: 4.2.3.2-5

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Subcutaneous injection

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

GLP Compliance: Yes

Special Features: Immunohistochemistry

No Observed Adverse Effect Level: 0.3 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**0.3**		**1**		**6**	
Number of Animals		**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Toxicokinetics:									
Day 1	No. evaluated	5	5	5	5	5	5	5	5
Cmax (µg/mL)		NA	NA	3.85	3.90	11.3	13.0	74.4	67.5
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	858	875	2270	2868	15042	14740
Day 183	No. evaluated	5	5	5	4	5	5	5	5
Cmax (µg/mL)		NA	NA	5.36	5.46	16.6	22.9	119	104
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	1219	1240	3694	5130	22525	20729
ADA analysis [a]		NA	NA	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Noteworthy findings									
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (qualitative)		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Table 2.6.7.7E: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20039148

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**0.3**		**1**		**6**	
Number of Animals		**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Ophthalmology		-	-	-	-	-	-	-	-
Physiological examinations		-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (Day 196)									
Red blood cells (10^6/µL)		6.100	5.766	6.614	6.335	6.646	6.616	7.200*	7.242*
Hemoglobin (g/dL)		14.52	13.40	15.22	14.28	15.34	15.36*	15.92*	15.68*
Hematocrit (%)		46.94	42.68	48.98	46.18	49.64	49.32*	51.44*	51.86*
Reticulocytes (10^9/µL)		75.72	76.20	-	-	-	-	116.36*	187.80*
Red cell distribution width (%)		13.44	13.46	-	-	14.14	-	14.04	14.14
Mean corpuscular hemoglobin (pg)		23.88	23.38	-	-	-	-	22.18	21.70
Mean corpuscular volume (fL)		77.08	-	-	-	-	-	71.50*	-
Monocytes (10^3/µL)		0.40	0.35	-	-	-	0.59*	0.56	0.57
Serum Chemistry (Day 196)									
Blood urea nitrogen (mg/dL)		23.00	18.40	-	-	-	-	27.40	23.80
Creatinine (mg/dL)		0.66	0.58	-	-	0.78	0.82*	0.82	0.90*
Alkaline phosphatase (U/L)		586.6	327.8	-	-	-	463.6	840.8	-
Ferritin (ng/mL)		25.72	18.84	-	-	-	-	41.46	37.06
Coagulation		-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-	-
Urine biomarkers									
Microalbumin:creatinine ratio (mg/g)[b]	Day 29	4.89	4.90	-		-	64.7	133	36.7
	Day 85	4.40	14.57	-		-	570	243	130

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7E: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20039148

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**0.3**		**1**		**6**	
Number of Animals		**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
	Day 169	5.67	12.06	-		-	495	631	129
	Day 196	6.41	65.00	-		-	187	747	351
Gross pathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopatholgy (Day 197)	No. evaluated	3	3	3	3	3	3	3	3
Kidney									
Membranoproliferative glomerulonephritis									
Minimal		0	0	-	-	3	1	1	1
Mild		0	0	-	-	-	-	1	2
Moderate		0	-	-	-	-	-	1	-
Accumulation, protein, tubular epithelium (cytoplasmic)									
Minimal		0	0	-	-	-	-	1	1
Tubular cast, protein									
Minimal		0	0	-	-	-	-	1	1
Infiltrate, mixed cell, interstitial									
Minimal		-	0	-	-	-	-	-	1
Mild		0	-	-	-	-	-	1	-
Fibrosis/fibroplasia, interstitium									
Minimal		-	0	-	-	-	-	-	2
Moderate		0	-	-	-	-	-	1	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7E: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20039148

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**0.3**		**1**		**6**	
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Degeneration/atrophy, tubular, medullary								
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	3
Moderate	0	-	-	-	-	-	1	-
Vacuolation, interstitial cell and increased extracellular matrix, medullary								
Minimal	0	0	-	-	2	1	-	1
Mild	-	0	-	-	-	-	-	2
Hemorrhage, acute, interstitial								
Minimal	-	0	-	-	-	1	-	-
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Hemorrhage, tubular								
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Pigment deposition (pigmentation), hemosiderin, interstitial								
Minimal	0	-	-	-	-	-	1	-
Brain (choroid plexus)								
Infiltrate, mixed cell								
Minimal	0	0	-	-	1	1	1	3
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Degeneration, vascular								
Minimal	0	0	-	-	2	1	1	3

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7E: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20039148

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**0.3**		**1**		**6**	
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Deposition, protein, interstitial								
Minimal	0	0	-	-	1	1	-	2
Mild	0	-	-	-	-	-	2	-
Infiltrate, foamy macrophages, interstitial								
Minimal	0	0	-	-	-	1	1	2
Mild	-	0	-	-	-	-	-	1
Pigmented macrophages (presumptive hemosiderin), interstitial								
Minimal	0	0	-	-	-	-	2	1
Lymph node, mandibular								
Extramedullary hematopoiesis, medullary								
Minimal	0	0	-	-	1	2	1	1
Mild	-	0	-	1	-	-	-	1
Moderate	-	0	-	1	-	-	-	1
Lymph node, axillary								
Extramedullary hematopoiesis, medullary								
Minimal	-	0	-	1	-	-	-	-
Mild	-	0	-	-	-	-	-	1
Moderate	-	0	-	-	-	-	-	1
Immunohistochemistry[c]								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7E: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20039148

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**0.3**		**1**		**6**	
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Kidney: Increased IgG, IgM, and/or C3-containing granular deposits in intramembranous and/or mesangial locations	0/1	0/1	NA	NA	3/3	0/1	3/3	2/3
Brain: Increased C3 granularity in choroid plexus interstitium	0/1	0/1	NA	NA	0/2	1/1	2/2	1/3
Brain: Increases in non-granular or diffuse IgG, IgM, and albumin in choroid plexus interstitium	0/1	0/1	NA	NA	0/2	0/1	2/2	0/3
Postdose evaluation No. evaluated	2	2	2	2	2	2	2	2
Serum chemistry (Day 280)								
Alkaline phosphatase (U/L)	614.5	-	-	-	-	-	1147 [d]	-
Histopathology								
Kidney								
Membranoproliferative glomerulonephritis								
Minimal	0	0	-	-	-	-	2	2
Infiltrate, mixed cell, interstitial, medullary								
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Fibrosis/fibroplasia, glomerular, periglomerular								
Minimal	0	1	-	-	-	-	2	1
Atrophy, glomerular								
Minimal	0	0	-	-	2	1	2	1
Hypertrophy/hyperplasia, juxtaglomerular apparatus								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.7E: Repeat-dose Toxicity in Monkeys (Continued) Study No. 20039148

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**0.3**		**1**		**6**	
Number of Animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Minimal	0	0	-	-	2	1	2	1
Degeneration/regeneration, tubular, cortical								
Minimal	-	0	-	-	-	1	-	-
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Degeneration/atrophy, tubular, medullary								
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Mild	0	-	-	-	-	-	2	-
Vacuolation, interstitial cell and/or increased extracellular matrix, medullary								
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	1
Mild	0	-	-	-	-	-	2	-
Hemorrhage, acute, interstitial								
Minimal	0	-	-	-	-	-	1	-
Pigment deposition (pigmentation), hemosiderin, interstitial								
Minimal	0	-	-	-	-	-	1	-
Brain, choroid plexus								
Fibrosis, interstitial								
Minimal	0	-	-	-	-	-	1	-
Infiltrate macrophage, protein laden, interstitial								
Minimal	0	-	-	-	-	-	1	-

[a] No. positive animals post-dose/total no. evaluated.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

[b] There were mild to moderate luspatercept-related increases in urine microalbumin:creatinine ratio in 3 animals (Animal Nos. 3504 [1 mg/kg], 4003, and 4505 [6 mg/kg]) at most time points between Days 29 and 196; individual value included in table (Control values are group mean).

[c] No. staining positive/No. evaluated

[d] Remained elevated in one animal (No. 4004) at the end of the recovery period; individual value included in table.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; C3 = complement component 3; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; IgG = immunoglobulin G; IgM = immunoglobulin M; NA = not applicable; No. = number; Q2W or q2wk = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当なし。

9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当なし。

10 がん原性試験

該当なし。

11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Table 2.6.7.11: Reproductive and Developmental Toxicity Non-Pivotal Studies

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg/dose)	No. per Group	Noteworthy Findings	Study No.
Rat/ Crl:CD(SD) Sprague Dawley	Subcutaneous (10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2)	GD 3 and 10 [a]	0, 3, 15, 30, 60	6 for main study; 6 for TK study (3, 15, 30, 60 mg/kg)	No luspatercept-related mortality. ≥ 30 mg/kg: ↑ in the average number of early resorptions per litter at 30 and 60 mg/kg (1.2 and 1.8, respectively, vs. 0.3 in controls); Reduced combined fetal BW at 30 and 60 mg/kg (88% and 89% of controls, respectively) No luspatercept-treated animals had any detectable post-dose positive ADA response on GD 16/17 [b].	20040547
Rabbit/ New Zealand White	Subcutaneous (10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2)	GD 4 and 11 [c]	0, 10, 25, 40	5 for main study; 3 for TK study (10, 25, 40 mg/kg)	No mortality ≥ 25 mg/kg: Reduced combined fetal BW at 25 and 40 mg/kg (94% and 82% of controls, respectively). 40 mg/kg: Reduced maternal FC for the interval GD 4 to 29 (up to 15%); One fetus had a cleft palate [d] One animal at 10 mg/kg was confirmed ADA+ on GD 29 during immunocompetition analysis.	20040549

[a] Based on the pharmacokinetic characteristics of the drug, subcutaneous administration on GD 3 should have resulted in maximum concentration in the circulation on GD 6 (approximate time of implantation). Based on the terminal half-life of 4.8 days, the second injection was on GD 10. This schedule of dosing ensured adequate drug was in the circulation from the time of implantation to closure of the palate.

[b] One main study animal in vehicle group was found to be positive for anti–luspatercept antibody on GD 17. This single positive finding falls within the 5% false positive rate for this assay.

[c] Based on the pharmacokinetic characteristics of the drug, subcutaneous administration on GD 4 should have resulted in maximum concentration in the circulation on GD 7 (approximate time of implantation). With a terminal half-life of 7 days, the second injection was on GD 11. Adequate drug should have been in the circulation from the time of implantation to closure of the palate.

[d] The small number of litters evaluated in a dose-range study makes it difficult to directly attribute this finding to luspatercept, although it cannot be ruled out. All other fetuses were grossly normal.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; BW = body weight; FC = food consumption; GD = gestation day; No. = number; TK = toxicokinetic; ↑ = increase; + = positive.

Approved v1.0

12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Table 2.6.7.12A: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats

Report Title: ACE-536: Fertility and Early Embryonic Development to Implantation Administered Subcutaneously to Rats

Test Article: Luspatercept

Design similar to ICH 4.1.1? Yes

Duration of Dosing: M: Q2W beginning 28 days before cohabitation for 4 weeks (4 doses); F: prior to mating (Day 1), on Day 15 and GD 3 (3 doses) [a]

Study No.: 20040551

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley

Location in Dossier: 4.2.3.5.1-1

Initial Age: M: 11 weeks; F: 10 weeks

Day of C-Section: GD 13

Day of Mating: Day 0

Method of Administration: Subcutaneous injection

GLP Compliance: Yes

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

Special Features: None

No Observed Adverse Effect Level: F_0 Males: 15 mg/kg; **F_0 Females:** 3 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		0 (Control)	1	3	15
F_0 Males	No. evaluated	25	25	25	25
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0
Clinical observations [b]					
Limited use of hindlimb(s)		2/1	-	-	1/1
Body weight (%)		-	-	-	-
Food consumption (%)		-	-	-	-
Necropsy observations		-	-	-	-
Mean no. of days prior to mating		-	-	-	-
Number of males that mated		-	-	-	-
Number of fertile males		-	-	-	-
F_0 Females	No. evaluated	25	25	25	25
No. Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0

Abbreviations: GD = gestation day; F = female; M = male; Q2W = once every 2 weeks; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Table 2.6.7.12A: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20040551

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)	1	3	15
Clinical observations [b]				
Limited use of hindlimb(s)	0/0	-	-	14/3
Swollen hindlimb	0/0	-	-	22/3
Impaired or no grip reflex	0/0	-	-	9/3
Premating body weight (%)	-	-	-	-
Gestation body weight (%)	-	-	-	-
Premating food consumption (%)	-	-	-	-
Gestation food consumption (%)	-	-	-	-
Mean no. estrous cycles/14 days	-	-	-	-
Mean no. days prior to mating	-	-	-	-
No. of females sperm positive	-	-	-	-
No. of pregnant females	-	-	-	-
No. aborted or with total resorption of litter	-	-	-	-
Mean no. corpora lutea	16.6	-	-	12.8**
Mean no. implantation sites	15.0	-	-	12.1**
Mean % pre-implantation loss	-	-	-	-
Mean no. viable embryos	14.1	-	-	11.2**
Mean no. resorptions	-	-	-	-
No. dead embryos	-	-	-	-
Mean % post-implantation loss	-	-	-	-

[a] One female rat not mated after a 21-day cohabitation period, was presumed to be pregnant on the last day of cohabitation (study day 33) and was euthanized after receiving 2 doses of 1 mg/kg luspatercept because it was pregnant (approximately GD 14) and was inadvertently not administered the third dose on GD 3.

[b] Incidence/no. of animals affected

Abbreviations: GD = gestation day; F = female; M = male; Q2W = once every 2 weeks; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.12B: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats

Report Title: ACE-536: Study of Female Fertility and Early Embryonic Development to Implantation in Rats (ICH4.1.1)

Test Article: Luspatercept

Design similar to ICH 4.1.1? Yes

Duration of Dosing: M: Not dosed; used for breeding only;
F: Dosed on Days 1, 15, and 29

Study No.: ACE-536-TOX-2734

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley

Location in Dossier: 4.2.3.5.1-2

Initial Age: M: 10 weeks; F: 9 weeks

Day of C-Section: GD 13

GLP Compliance: Yes

Day of Mating: Terminal Females: Study Day 15
Recovery Females: Study Day 127

Method of Administration: Subcutaneous injection

Vehicle/Formulation: 9% sucrose, 0.02% polysorbate 80 in a 10 mM citrate buffer in sterile water for injection, USP (pH 6.3 to 6.7)

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]

Special Features: Hormone analysis (LH, FSH, progesterone, and estradiol concentrations)

No Observed Adverse Effect Level: Not assessed in this study. All test-article related findings at 15 mg/kg were fully recoverable.

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**	**15**
Terminal Females [a]	No. evaluated	22	22
Plasma Concentration		-	Luspatercept exposure was maintained throughout the dosing period
No. died or sacrificed moribund		0	0
Clinical observations [c]		-	-
Food consumption		-	-
Necropsy observations		-	-
Organ weights (%) [a]			
Ovaries		0.1132 g	−11.3*
Uterus with cervix		8.5842 g	−24.5**
Hormone analysis (GD 13)			
FSH (ng/mL)		5.36	2.60**
Premating body weight		-	-
Gestation body weight		-	-
Premating body weight change		-	-

Abbreviations: F = female; M = male; FSH = follicle stimulating hormone; GD = gestation day; LH = luteinizing hormone; No. = number;
* = $p \leq 0.05$ stastically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.12B: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. ACE-536-TOX-2734

Dose (mg/kg/dose)		0 (Control)	15
Gestation body weight change (%)[b]			
GD 0 to 4		23.1 g	−21
GD 0 to 7		33.3 g	−8
GD 7 to 10		18.6 g	−34**
GD 10 to 13		13.6 g	−17
GD 0 to 13		65.4 g	−17*
Premating food consumption		-	-
Gestation food consumption		-	-
Mean No. estrous cycles		-	-
Mean No. days prior to mating		2.6	3.3*
No. of females mated		-	-
No. of pregnant females		-	-
No. aborted or with total resorption of litter		-	-
Mean No. corpora lutea		-	-
Mean No. implantations		14.4	10.8**
Mean % preimplantation loss		13.36	27.16**
Mean No. viable embryos		13.5	10.0**
Mean No. resorptions		-	-
Mean % postimplantation loss		-	-
Recovery Females[c]	No. evaluated	22	22
Plasma concentration		-	Luspatercept exposure was maintained throughout the dosing period
Hormone analysis		-	-
No. died or sacrificed moribund		0	0

Abbreviations: F = female; M = male; FSH = follicle stimulating hormone; GD = gestation day; LH = luteinizing hormone; No. = number;
* = $p \leq 0.05$ stastically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.12B: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. ACE-536-TOX-2734

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)	15
Clinical observations	-	-
Necropsy observations	-	-
Organ weights	-	-
Premating body weight	-	-
Gestation body weight	-	-
Premating body weight change	-	-
Gestation body weight change	-	-
Premating food consumption	-	-
Gestation food consumption	-	-
Mean No. estrous cycles	-	-
Mean No. dys prior to mating	-	-
No. of females mated	-	-
No. of pregnant females	-	-
No. aborted or with total resorption of litter	-	-
Mean No. corpora lutea	-	-
Mean No. implantations	-	-
Mean % preimplantation loss	-	-
Mean No. viable embryos	-	-
Mean No. resorptions	-	-
Mean % postimplantation loss	-	-

[a] Cohabitated after the second dose.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data and not on the percent differences. All percent difference values are rounded to the nearest whole number.

[c] Cohabitated 14 weeks after the third dose.

Abbreviations: F = female; M = male; FSH = follicle stimulating hormone; GD = gestation day; LH = luteinizing hormone; No. = number;
* = $p \leq 0.05$ stastically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Table 2.6.7.13A: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats

Report Title: ACE-536: Subcutaneous Embryo-fetal Development Study in Rats | **Test Article:** Luspatercept

Design similar to ICH 4.1.3? Yes | **Duration of Dosing:** GD 3 and GD 10 | **Study No.:** 20040548

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley | **Day of Mating:** Day 0 (GD 0) | **Location in Dossier:** 4.2.3.5.2-2

Initial Age: 10-11 weeks | **Day of C-Section:** GD 21

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted] | **Method of Administration:** Subcutaneous injection | **GLP Compliance:** Yes

Special Features: None | **Vehicle/Formulation:** 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

No Observed Adverse Effect Level: Maternal toxicity: >30 mg/kg; **Embryo-fetal effects:** 5 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**	**5**	**15**	**30**
Dams	No. evaluated	25	25	25	25
Toxicokinetics:	No. evaluated	3	6	6	6
GD 3 (1st dose)	Cmax (µg/mL)	NA	45.5	130	262
	AUC(0-168h) (µg·h/mL)	NA	5818	15750	28543
GD 10 (2nd dose)	Cmax (µg/mL)	NA	58.2	171	326
	AUC(0-168h) (µg·h/mL)	NA	6166	16128	34488
GD 21					
Maternal concentration (µg/mL) - GD 20 [a]		NA	0.982	1.20	6.41
Fetal concentration (pooled) (µg/mL) - GD 21		NA	1.19	1.38	3.61
Fetal:maternal concentration ratio		NA	1.21	1.15	0.56
ADA analysis GD 21 [b]		0/3	0/6	2/6	1/6
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0
Clinical observations [c]					
Slight discoloration – hindpaw and/or hindlimb		0/0	-	-	8/2

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-168h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 168 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; GD = gestation day; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Table 2.6.7.13A: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20040548

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)	5	15	30
Limited use of hindlimb and/or hindpaw	0/0	-	-	6/2
Digits curled (hindpaw)	0/0	-	-	6/2
Swollen hindlimb and/or hindpaw	0/0	-	-	13/2
Impaired gripping reflex	0/0	-	-	2/2
Mild dehydration	0/0	-	-	3/1
Hunched posture	0/0	-	-	3/1
Gestation body weight - GD 21 (%) [d]	393.1 g	-	-	−3.0
Gestation body weight gains - GD 3-21 (%) [d]	152.5 g	-	-	−7.8
Gestation food consumption (%)	-	-	-	-
Necropsy observations (incidence)				
Clear fluid-filled sac surrounding kidney	0	-	-	2
Gravid uterine weight (%) [d]	98.4 g	−9.1*	−8.0*	−12.6**
No. pregnant (% evaluated)	25 (100)	-	-	21 (84)**
No. with all conceptuses dead or resorbed - N (%)	0 (0)	-	-	1 (5) [e]
Mean no. corpora lutea	-	-	-	-
Mean no. implantation sites	-	-	-	-
Mean % preimplantation loss	-	-	-	-
Mean % postimplantation loss	4.3	-	-	12.7
Mean no. resorptions	0.6	-	-	1.7
Litters:				
No. litters evaluated	25	24	25	20
Mean litter size	13.0	-	-	11.3

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-168h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 168 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; GD = gestation day; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.13A: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. 20040548

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)	5	15	30
Mean no. live fetuses	13.0	-	-	11.3
Mean no. dead fetuses	-	-	-	-
Mean fetal body weight (%) [d]	5.59 g	-	−6.1**	−7.1**
Fetal sex ratios (% males)	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Fetal anomalies:				
External examinations	-	-	-	-
Visceral examinations	-	-	-	-
Skeletal examinations				
Sternal centra, asymmetric [f]				
Litter incidence - No. (%)	0 (0)	0 (0)	3 (12.0)**	0 (0)
Fetal incidence - No. (%)	0 (0)	0 (0)	4 (2.4)**	0 (0)

[a] Serum concentrations at 240 hours post GD 10-dose.

[b] No. positive post-dose/total no. evaluated. Although positive responses were not titered, the screening signal to noise ratios were all ≤ 2-fold, indicating low affinity or low abundance antibodies. These animals were included in the toxicokinetics parameter calculations.

[c] Incidence/ no. of animals affected. Findings were observed during GD 14 to GD 20.

[d] For controls, group means are shown. For the test article-treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical analyses are based on the actual values, not the percent differences.

[e] This dam may have delivered a litter early and cannibalized its litter as its body weight dropped from 381 g to 290 g on GD 18 to GD 21, respectively. The dam may have been a mistimed pregnancy.

[f] Lack of skeletal variations at 30 mg/kg may be due to increased embryo-fetal death at that dose level.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-168h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 168 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; GD = gestation day; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.13B: Reproductive and Developmental Toxicity in Rabbits

Report Title: ACE-536: Subcutaneous Embryo-fetal Development Study in New Zealand White Rabbits
Test Article: Luspatercept
Design similar to ICH 4.1.3? Yes
Duration of Dosing: GD 4 and GD 11
Study No.: 20040550
Species/Strain: Rabbits/ New Zealand White
Day of Mating: Day 0 (GD 0)
Location in Dossier: 4.2.3.5.2-4
Initial Age: 5 months
Day of C-Section: GD 29
Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]
Method of Administration: Subcutaneous injection
GLP Compliance: Yes
Special Features: None
Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2
No Observed Adverse Effect Level: Maternal Toxicity: 5 mg/kg; **Embryo fetal effects:** 5 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**	**5**	**20**	**40**
Dams	No. evaluated	25	25	25	25
Toxicokinetics:					
GD 4 (first dose)	No. evaluated	0	3	3	3
Cmax (µg/mL)		NA	59.1	179	370
AUC(0-168h) (µg·h/mL)		NA	7794	22216	47160
GD 11 (second dose)	No. evaluated [a]	0	2	2	3
Cmax (µg/mL)		NA	91.1	279	616
AUC(0-168h) (µg·h/mL)		NA	12420	36314	75690
GD 29	No. evaluated [a]	0	2	2	3
Maternal concentration (µg/mL) [b]		NA	3.90	19.2	13.6
Fetal concentration (pooled) (µg/mL)		NA	3.46	4.86	12.5
Fetal:maternal concentration ratio		NA	0.9	0.3	0.9
ADA analysis [c]		0/3	1/3	1/3	0/3
No. died or sacrificed moribund		1 [d]	0	0	0

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-168h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 168 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; GD = gestation day; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.13B: Reproductive and Developmental Toxicity in Rabbits (Continued) Study No. 20040550

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)	5	20	40
Clinical observations [e]				
Scant feces	13/6 [d]	-	38/11	55/12
Swollen eyelids	0/0	-	3/3	5/3
Red eye(s)	0/0	-	15/5**	21/6**
Thin body condition	0/0	-	-	7/5**
Lacrimation	0/0	-	-	3/2
Reddened conjunctiva	0/0	-	-	2/2
Injection site flaking	0/0	-	-	18/3
Ptosis	0/0	-	-	4/1
Red urine	0/0	-	-	1/1
Swelling (urogenital, perioral and facial areas)	0/0	-	-	9/2
Limited use of forelimb/abnormal gait	0/0	-	-	1/1
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight GD 29 (%) [f]	3.63 kg	-	−5.2*	−8.0**
Corrected body weight - gravid uterine weight (%) GD 29 [f]	3.08 kg	-	-	−3.9
Gestation food consumption (%) [f]	137.6 g/day	-	−13.2**	−15.7**
Mean no. corpora lutea	-	-	-	-
Mean no. implantations	-	-	-	-
Mean % preimplantation loss	-	-	-	-
Mean % postimplantation loss	1.5	-	-	16.3**
Mean no. resorptions	0.1	-	-	1.6**
Does with any resorptions - N (%)	3 (13.6)	-	10 (41.7)**	12 (54.5)**

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-168h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 168 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; GD = gestation day; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.13B: Reproductive and Developmental Toxicity in Rabbits (Continued) Study No. 20040550

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)	5	20	40
Litters:				
No. litters evaluated	**22**	**25**	**24**	**22**
Mean litter size	9.8	-	-	7.3**
Mean no. live fetuses	9.8	-	-	7.3**
Mean no. dead fetuses	-	-	-	-
Mean fetal body weight (%) [f]	40.90 g	-	−10.4*	−14.5**
Fetal sex ratios (% males)	-	-	-	-
Fetal anomalies: [g]				
Litters with fetuses with alteration - N (%)	10 (45.4)	-	-	19 (86.4)**
Fetuses with alteration - N (%)	11 (5.1)	-	-	37 (23.1)**
Total affected fetuses with alteration/litter (%)	5.2	-	-	22.6**
External examinations	-	-	-	-
Visceral examinations	-	-	-	-
Skeletal examinations				
Ossification sites per fetus per litter				
Forelimb, phalanges	13.83	-	-	13.55*

[a] One ADA positive animal at each of 5 and 20 mg/kg excluded from toxicokinetics analysis on GD 11, and maternal and fetal values were excluded from group means on GD 29.

[b] Serum concentrations at 432 hours post GD 11-dose.

[c] No. positive post-dose/total no. evaluated.

[d] One control female (No. 3715) aborted and was euthanized on GD 25.

[e] Incidence/ no. of animals affected.

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

[g] Increased number of litters, number of fetuses and % fetuses per litter with alterations due to skeletal variations of the hyoid and sternebrae at 40 mg/kg.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-168h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 168 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; GD = gestation day; NA = not applicable; No. = number; - = no noteworthy findings;
* = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Table 2.6.7.14: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats

Report Title: ACE-536: Evaluation of Effects on Pre and Postnatal Development Including Maternal Function in Rats | **Test Article:** Luspatercept

Design similar to ICH 4.1.2? Yes | **Duration of Dosing:** GD 6 – PND 20 Q2W (GD 6, GD 20, and 14 days following the GD 20 dose) | **Study No.:** ACE-536-TOX-2485

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley | **Day of Mating:** Day 0 (GD 0) | **Location in Dossier:** 4.2.3.5.3-1

Initial Age: ~10 weeks | **Method of Administration:** Subcutaneous injection

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted] | **Vehicle/Formulation:** 9% sucrose, 0.02% polysorbate 80 in a 10 mM citrate buffer in sterile water for injection, USP (pH 6.3 to 6.7)

Special Features: None | **Litters culled/Not culled:** Culled | **GLP Compliance:** Yes

No Observed Adverse Effect Level: F_0 Females: 30 mg/kg; **F_1 Males and F_1 Females:** 30 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		0 (Control)	3	10	30
F_0 Females	No. evaluated	22	22	22	22
Toxicokinetics:	No. evaluated	6	6	6	6
Fetal:maternal ratio (8 hour)		NA	24.8	21.2	7.9
Fetal:maternal ratio (24 hours)		NA	8.6	9.8	8.2
No. died or sacrificed moribund [a]		0	0	0	1
Clinical observations [b]					-
Swelling (hind limb/right)		0/0	0/0	0/0	1/1
Body weight (%)		-	-	-	-
Body weight change		-	-	-	-
Food consumption (%) [c]					
LD 7-10 [d]		52.32 g/day	-	-	−12**
Mean gestation length (days)		-	-	-	-
Necropsy observations					
Foot/feet, swollen/thickened, moderate		0	-	-	1

Abbreviations: GD = gestation day; LD = lactation day; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Table 2.6.7.14: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. ACE-536-TOX-2485

Dose (mg/kg/dose)		0 (Control)	3	10	30
F_1 litters (preweaning)	No. evaluated	22	22	22	21
Mean no. pups at Day 0 (total pups born/litter)		12.3	12.5	12.5	12.4
Mean no. live pups/litter Day 21 (weaning)		-	-	-	-
Sex ratios (% males/animal) (mean %/litter)		-	-	-	-
Clinical observations		-	-	-	-
Pup body weight (least square mean) (%) [e]					
Males + Females					
LD 0		7.20 g	−8**	−8**	−11**
LD 4 (preculling)		12.23 g	−12**	−14**	−19**
LD 4 (postculling)		12.29 g	−12**	−15**	−19**
LD 7		20.27 g	−13**	−16**	−22**
LD 14		39.88 g	−10**	−11**	−17**
LD 21		63.80 g	−11**	−13**	−20**
PND 28		107.56 g	−9**	−10**	−17**
Physical development		-	-	-	-
Necropsy observations		-	-	-	-
F_1 Males (postweaning)	No. evaluated	22	22	22	22
No. died or sacrificed moribund [f]		0	0	0	1
Clinical observations		-	-	-	-
Body weight (%) [e]					
Premating					
Week 1		116.1 g	−11**	−13**	−20**
Week 7		496.5 g	−10**	−8**	−9**

Abbreviations: GD = gestation day; LD = lactation day; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.14: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. ACE-536-TOX-2485

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**	**3**	**10**	**30**
Postmating					
Week 13		648.0 g	−6	−7*	−6
Preputial separation (days)		40.7	-	43.1*	44.9**
Behavioral observations (motor activity)		-	-	-	-
Behavioral observations (passive avoidance)		-	-	-	-
Male mating index (%)		-	-	-	-
Male fertility index (%)		-	-	-	-
Male fecundity index (%)		-	-	-	-
Necropsy observations		-	-	-	-
Organ weights (PND 28)		-	-	-	-
Histopathology (PND 28)	No. evaluated	64	69	59	59
Kidneys (PND 28 pups)					
Atrophy/hypoplasia, tubular					
Minimal		0	2	1	1
Mild		0	-	1	-
Ectasia					
Minimal		0	-	1	12
Mild		0	-	-	3
Glomerulonephritis, membranoproliferative					
Minimal		0	2	-	1
Hemorrhage					
Minimal		0	-	-	7

Abbreviations: GD = gestation day; LD = lactation day; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.14: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. ACE-536-TOX-2485

Dose (mg/kg/dose)		0 (Control)	3	10	30
F_1 Females (postweaning)	No. evaluated	22	22	22	22
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0
Clinical observations		-	-	-	-
Premating body weight (%)[c]					
Week 1		101.5 g	−7*	−6*	−13**
Week 2		149.3 g	−5*	−4	−11**
Gestation body weight (%)		-	-	-	-
Vaginal opening (days)		-	-	-	-
Behavioral observations (Motor Activity)		-	-	-	-
Behavioral observations (Passive Avoidance)		-	-	-	-
Copulatory interval (days)		-	-	-	-
Female mating index (%)		-	-	-	-
Female fertility index (%)		-	-	-	-
Female fecundity index (%)		-	-	-	-
No. of females with confirmed mating day		-	-	-	-
Necropsy observations		-	-	-	-
Organ Weights (PND 28 Pups)		-	-	-	-
Histopathology (PND 28)	No. evaluated	65	63	73	64
Kidneys					
Atrophy/hypoplasia, tubular					
Minimal		0	1	1	1
Mild		0	-	-	2
Ectasia					

Abbreviations: GD = gestation day; LD = lactation day; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.14: Reproductive and Developmental Toxicity in Rats (Continued) Study No. ACE-536-TOX-2485

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)	3	10	30
Minimal	0	-	1	15
Mild	0	-	-	8
Glomerulonephritis, membranoproliferative				
Minimal	0	1	-	2
Hemorrhage				
Minimal	0	-	-	8
Mild	0	-	-	1
Cesarean section observations No. evaluated	22	22	22	22
No. pregnant	21	21	21	22
No. aborted or with total resorption of litter	-	-	-	-
Mean no. corpora lutea	-	-	-	-
Mean % preimplantation loss	-	-	-	-
Mean no. viable embryos	-	-	-	-
Mean % postimplantation loss	-	-	-	-
Litter size (mean no. per animal)	-	-	-	-

[a] One female at 30 mg/kg/dose (No. 417) was euthanized in moribund condition on GD 12. Clinical findings included, but were not limited to: limb function impaired, purple discolored skin, and swelling of the right hind limb/foot. Macroscopic findings of a moderately swollen/thickened foot correlated to clinical findings. Cause of moribundity is unclear, but was not considered to be related to luspatercept treatment.

[b] Incidence/ no. of animals affected.

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is presented. Statistical significance is based on the absolute values (not on the percent difference).

[d] Mean food consumption was decreased from LD 4 to LD 21 at 30 mg/kg, data only presented for LD 7 to LD 10.

[e] The least square means (adjusted for values of the covariate) are displayed. For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is presented. Statistical significance is based on the absolute values (not on the percent difference).

[f] One male at 30 mg/kg/dose (No. 4003) was found dead on Day 57. Clinical findings included sparse hair of the left forefoot. Macroscopic findings included a severely autolyzed large intestine. Cause of death is unclear, but was not considered to be related to luspatercept treatment.

Abbreviations: GD = gestation day; LD = lactation day; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

15 生殖発生毒性試験：新生児を用いた試験

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats

Report Title: A Dose Range Finding Toxicity Study of ACE-536 Administered Once Every Two Weeks (Total of 4 Doses) by Subcutaneous Injection in Juvenile Sprague Dawley Rats

Test Article: Luspatercept

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley

Duration of Dosing: PND 7-56 Q2W (Subset 1), PND 21-70 Q2W (Subset 2)

Study No.: [redacted]-961002

Initial Age: Subset 1: 7 days; Subset 2: 21 days

Duration of Postdose: Not applicable

Location in Dossier: 4.2.3.5.4-1

Date of First Dose: Subset 1: [redacted], 20[redacted]; Subset 2: [redacted], 20[redacted]

Method of Administration: Subcutaneous injection

Special Features: None

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

GLP Compliance: Yes

No Observed Adverse Effect Level: 1 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**6**		**15**	
Number of Animals		**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Toxicokinetics:									
Subset 1									
PND 7	No. evaluated	0	0	42	42	42	42	42	42
Cmax (µg/mL)		NA	NA	5.19	6.14	38.7	37.7	96.6	99.5
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	750	907	4266	4632	10342	11935
PND 49	No. evaluated	0	0	42	42	42	42	42	42
Cmax (µg/mL)		NA	NA	10.6	12.6	62.3	71.5	131	159
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	2415	2370	13543	15096	23896	30553
ADA analysis [a]		NA	NA	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
Subset 2									
PND 21	No. evaluated	0	0	39	39	39	39	39	39
Cmax (µg/mL)		NA	NA	9.33	21.7	54.5	60.7	137	148

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**6**		**15**	
Number of Animals		**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	1379	1832	8280	8986	19263	20657
PND 63	No. evaluated	0	0	39	39	39	39	39	39
Cmax (µg/mL)		NA	NA	14.1	12.6	67.9	79.7	163	167
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	2795	1956	15845	17317	32369	35310
ADA analysis [a]		NA	NA	2/9	4/9	0/9	0/9	0/9	1/9
Subset 1 (PND 7-56)									
Noteworthy findings	**No. evaluated**	6	6	6	6	6	6	6	6
No. died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical observations		-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight (%)[b]	PND 55	337.4 g	-	-	-	−7.30	-	−10.5*	-
Body weight change (%)[b]	PND 7-55	322.9 g	-	-	-	−7.70	-	11.0*	-
Food consumption		-	-	-	-	-	-	-	-
Mean age at preputial separation (days)		-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Mean age at vaginal patency (days)		NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Hematology (PND 56)									
Red blood cells (10^6/µL)		7.65	7.96	8.24*	8.11	9.37**	9.38*	9.38**	9.92**
Hemoglobin (g/dL)		15.3	15.9	16.2*	15.9	17.7**	17.9	18.2**	18.6**
Hematocrit (%)		46.5	47.4	49.6*	47.3	54.7**	54.0	56.5**	56.8**
Mean corpuscular volume (fL)		60.8	59.6	-	-	58.4**	57.7	57.5**	57.3
Mean corpuscular hemoglobin (pg)		20.0	19.9	-	-	18.9**	19.2	18.4**	18.8*
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)		32.8	33.5	-	-	-	-	32.1*	32.8

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		6		15	
Number of Animals	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Absolute reticulocytes (10^3/µL)	229.4	151.4	-	-	313.6**	209.6	381.9**	236.0**
Red cell distribution width (%)	12.5	12.6	-	-	13.5**	-	14.0**	13.5**
Hemoglobin distribution width (g/dL)	2.19	2.21	-	-	2.35**	-	2.43**	2.40
Platelets (10^3/µL)	1012	-	-	-	-	-	761*	-
Mean platelet volume (fL)	6.42	6.72	-	-	7.03*	7.42*	7.38**	7.37*
White blood cells (10^3/µL)	10.27	8.39	-	-	-	12.24	16.50**	13.83
Absolute lymphocytes (10^3/µL)	8.33	-	-	-	-	-	13.93*	-
Absolute neutrophils	-	0.96	-	-	-	2.34	-	2.57
Absolute monocyte (10^3/µL)	-	0.32	-	-	-	0.56	-	1.10**
Fibrinogen (mg/dL)	-	251	-	-	-	320*	-	327*
Clinical Chemistry (PND 56)								
Urea nitrogen (mg/dL)	13.3	16.4	-	-	17.9**	20.5*	21.6**	24.0**
Creatinine (mg/dL)	0.19	0.24	-	-	0.28*	0.35**	0.31**	0.39**
Alkaline phosphatase (U/L)	289	177	-	-	398*	279**	443**	292**
Alanine aminotransferase (U/L)	38	34	-	-	-	-	55**	66**
Aspartate aminotransferase (U/L)	-	135	-	-	-	-	-	247
Phosphorus (mg/dL)	-	8.7	-	-	-	10.4	-	10.5*
Potassium (mEq/L)	-	5.61	-	-	-	-	-	6.90*
Urinalysis [c]								
Gross pathology (PND 56) No. evaluated	6	6	6	6	6	6	6	6
Adrenal glands								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**6**		**15**	
Number of Animals	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Dark red area(s)	-	0	-	-	-	1	-	-
Enlarged	-	0	-	-	-	1	-	-
Mottled	-	0	-	-	-	1	-	-
Stomach								
Dark red area(s)	-	0	-	-	-	1	-	1
Organ weights (%)[b]								
Heart								
Absolute	1.49 g	0.95 g	-	-	−32.2**	−18.9**	−36.2**	−24.2**
Relative to body weight	0.491 g/100 g	0.473 g/100 g	-	-	−26.5**	−20.1**	−28.3**	−25.4**
Relative to brain weight	76.34 g/100 g	52.594 g/100 g			−31.1**	−19.1*	−34.4**	−20.6**
Kidneys			-	-				
Absolute	2.96 g	-	-	-	−13.9*	-	−14.5*	-
Relative to body weight	-	1.009 g/100 g	-	-	-	−13.4**	-	−9.0*
Liver								
Absolute	11.35 g	-	-	-	-	-	−17.4*	-
Relative to body weight	-	4.081 g/100 g	-	-	-	−9.0*	-	−11.0**
Histopathology								
Adrenal cortex								
Necrosis, coagulative								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		6		15	
Number of Animals	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Moderate	-	0	-	-	-	1	-	-
Severe	-	0	-	-	-	1	-	-
Congestion/hemorrhage								
Minimal	-	0	-	-	-	1	-	-
Moderate	-	0	-	-	-	2	-	-
Kidney								
Basophilia, tubule								
Minimal	1	1	-	-	4	-	5	5
Dilatation, tubule, medulla								
Minimal	0	2	-	-	1	1	1	-
Mild	1	0	-	-	3	2	2	5
Moderate	0	0	-	-	-	1	2	-
Mineralization, tubule, cortex								
Minimal	0	0		-	4	-	5	5
Atrophy/hypoplasia, tubule, medulla								
Minimal	0	0	-	-	3	2	1	-
Mild	0	0	-	-	1	-	2	2
Moderate	0	0	-	-	-	-	3	4
Glomerulonephritis, membranoproliferative								
Minimal	0	0	-	-	3	1	3	4
Mild	0	0	-	-	2	-	3	2

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**6**		**15**	
Number of Animals	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Stomach								
Mineralization, mucosal								
Minimal	0	0	5	2	4	2	1	5
Mild	0	-	-	-	1	-	2	-
Moderate	0	0	-	-	-	-	3	1
Dilation, glandular								
Minimal	0	0	2	1	5	-	2	3
Mild	0	0	-	-	-	-	3	1
Hemorrhage								
Minimal	-	0	-	-	-	1	-	1
Necrosis, glandular epithelium								
Mild	-	0	-	-	-	1	-	1
Marrow, sternum								
Decreased myeloid:erythroid ratio								
Minimal	-	0	-	-	-	-	-	3
Subset 2 (PND 21-70)								
Noteworthy findings **No. evaluated**	6	6	6	6	6	6	6	6
No. died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical observations [d]								
Impaired use of left hindlimb	-	0/0	-	-	-	-	-	4/1
Body weight (%)	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**6**		**15**	
Number of Animals	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Food consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean age at preputial separation (days)	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Mean age at vaginal patency (days)	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Hematology (PND 70)								
Red blood cells (10^6/µL)	8.43	8.40	8.53	9.1	10.28**	9.99**	11.07**	11.26**
Hemoglobin (g/dL)	16.1	16.0	15.9	16.8	18.3*	18.2*	19.1*	19.8**
Hematocrit (%)	48.2	46.5	47.8	49.0	55.5**	54.7*	60.6**	59.8**
Mean corpuscular volume (fL)	57.1	55.4	-	-	54.0	-	54.8	53.1*
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	19.1	19.0	-	-	17.8	18.2*	17.2**	17.6**
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dL)	33.5	34.4	-	-	-	33.4*	31.4*	33.0**
Absolute reticulocyte (10^3/µL)	180.5	110.8	-	-	219.0	171.9*	288.7**	225.8**
Red cell distribution width (%)	11.5	11.1	-	-	12.3*	11.8*	12.9**	12.6**
Mean platelet volume (fL)	6.13	5.77	-	-	6.87*	6.20	6.90**	6.68**
White blood cells (10^3/µL)	-	6.86	-	-	-	10.94*	-	10.91*
Absolute neutrophil (10^3/µL)	1.23	0.75	-	-	2.59*	1.56	1.95	2.24
Absolute lymphocyte (10^3/µL)	-	5.64	-	-	-	8.72*	-	7.90
Absolute monocyte (10^3/µL)	0.51	0.36	-	-	0.73	0.56	1.54**	0.74
Serum chemistry (PND 70)								
Urea nitrogen (mg/dL)	11.4	15.4	-	-	16.6**	19.2*	19.7**	23.7**
Creatinine (mg/dL)	0.22	0.29	-	-	0.31*	0.38*	0.33**	0.39*
Alkaline phosphatase (U/L)	182	112	-	-	268*	-	273*	241**

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**6**		**15**	
Number of Animals		**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Alanine aminotransferase (U/L)		39	34	-	-	51*	53*	61**	61**
Aspartate aminotransferase (U/L)		87	92	-	-	122**	-	120*	137*
Chloride (mEq/L)		-	104	-	-	-	-	-	100*
Phosphorus (mg/dL)		-	6.8	-	-	-	7.8*	-	8.2**
Urinalysis [e]									
Gross pathology (PND 70)	No. evaluated	6	6	6	6	6	6	6	6
Stomach									
Dark red area(s)		0	-	-	-	-	-	1	-
Organ Weights (%) [b]									
Heart									
Absolute		1.69 g	1.18 g	-	−18.6**	−29.6**	−20.3**	−30.2**	−29.7**
Relative to body weight		0.420 g/100 g	0.481 g/100 g	-	−18.1**	−26.0**	−22.5**	−26.0**	−29.5**
Relative to brain weight		83.778 g/100 g	63.800 g/100 g	-	−17.8**	−29.2**	−18.3**	−28.8**	−29.0**
Kidneys									
Absolute		3.57 g	-	-	-	−21.0**	-	−14.8*	-
Relative to body weight		0.885 g/100 g	0.816 g/100 g	-	-	−16.5**	-	−10.3*	−12.4**
Relative to brain wt		176.491 g/100 g	-	-	-	−20.1**	-	−13.4*	-
Histopathology									
Adrenal cortex									

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		6		15	
Number of Animals	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Necrosis, coagulative								
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Congestion/Hemorrhage								
Minimal	0	0	-	-	-	-	1	1
Mild	-	0	-	-	-	-	-	2
Kidney								
Basophilia, tubule								
Minimal	1	1	-	-	4	-	5	4
Mineralization, tubule, cortex								
Minimal	0	-	-	-	3	-	3	-
Glomerulonephritis, membranoproliferative								
Minimal	0	0	-	-	4	2	3	3
Mild	0	0	-	-	2	1	3	3
Stomach								
Mineralization, mucosal								
Minimal	0	0	3	-	5	4	3	5
Mild	0	-	-	-	-	-	2	-
Moderate	0	0	-	-	-	-	1	1
Dilation, glandular								
Minimal	0	0	1	-	1	-	5	1
Mild	0	0	-	-	-	-	1	1

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15A: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961002

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		6		15	
Number of Animals	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**	**M: 6**	**F: 6**
Necrosis, glandular epithelium								
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Marrow, sternum								
Decreased myeloid:erythroid ratio								
Minimal	-	-	-	-	-	-	-	4

[a] No. positive post-dose/total no. evaluated

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is presented. Statistical significance is based on the absolute values (not on the percent difference).

[c] On PND 56, minimally higher urine positive protein was noted in males and females at 6 and 15 mg/kg. This change was considered potentially luspatercept related.

[d] Incidence/no. of animals affected

[e] On PND 70, minimally higher urine positive protein was noted in males at 15 mg/kg. This change was considered potentially luspatercept-related.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared tocontrol group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile Toxicity Study in Rats

Report Title: A Juvenile (Postnatal Day 7) Toxicity Study of ACE-536 Administered Once Every Two Weeks (for a Total of 7 Doses) by Subcutaneous Injection in Juvenile Sprague Dawley Rats

Test Article: Luspatercept

Species/Strain: Rat/Crl:CD Sprague Dawley

Duration of Dosing: PND 7-91 Q2W

Study No.: [redacted]-961003

Initial Age: 7 days

Duration of Postdose: PND 91-233

Location in Dossier: 4.2.3.5.4-2

Date of First Dose: [redacted], 20[redacted] (Main study); [redacted], 20[redacted] (Immune assessment) [a]

Method of Administration: Subcutaneous injection

Vehicle/Formulation: 10 mM Tris-buffered saline, pH 7.2

GLP Compliance: Yes

Special Features: Immunophenotyping, T cell-dependent antibody response (TDAR) assessments, bone mineralization assessments, urinary biomarkers

No Observed Adverse Effect Level: F0 male and female systemic toxicity: < 1 mg/kg; F0 reproductive toxicity: 1 mg/kg (M) and < 1 mg/kg (F); F0 developmental and neurobehavioral toxicity: 3 mg/kg (M) and 10 mg/kg (F); F0 immune competence: 10 mg/kg; F1 embryonic toxicity: 10 mg/kg

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals (Main study) [a]		**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Toxicokinetics (Subset 3) [a]:									
PND 91	No. evaluated	15	15	42	42	42	42	42	42
Cmax (µg/mL)		NA	NA	10.2	10.6	37	38.1	91.2	97
AUC(0-336h) (µg·h/mL)		NA	NA	2883	2388	9108	7864	22142	17966
ADA analysis [b]		0/9	1/9	3/12	1/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Dosing period (Subsets 1 & 2) [a]	No. evaluated	32	32	32	32	32	32	32	32
Noteworthy findings:									
No. died or sacrificed moribund		1	1	2	1	2	1	3	3
No. evaluated		31	31	30	31	30	31	29	29
Clinical observations [c]									
Impaired use of hindlimbs		0/0	0/0	-	4/1	9/1	-	79/6	65/9
Swollen hindlimbs		0/0	0/0	-	5/1	15/2	-	118/6	145/10
Reddened hindlimbs		0/0	-	-	-	-	-	11/3	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals		**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Body weight (%) [d]	PND 91	551.4 g	-	-	-	-	-	−7.4*	-
Body weight change (%) [d]	PND 7-91	534.1 g	-	-	-	-	-	−7.7*	-
Food consumption (PND 38-42) (%) [d,e]		24.7 g	-	-	-	-	-	−12.1	-
Mean age at preputial separation (days)		43.9	NA	-	NA	-	NA	45.9**	NA
Mean age at vaginal patency (days)		NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Functional observational battery	No. evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Open field observations									
Mobility, slightly impaired		0	-	-	-	-	-	2	-
Gait score, slight impairment, but definite		0	-	-	-	-	-	2	-
Physiological observations									
Body temperature (°C)		37.1	-	-	-	-	-	35.9*	-
Hematology (PND 105)	No. evaluated	10	10	9	10	10	5	10	8
Red blood cells (10^6/µL)		8.35	8.44	8.89	8.94	9.17*	9.95**	9.58**	10.22**
Hemoglobin (g/dL)		14.2	15.6	15	16.3	15.2*	17.5*	15.7**	17.8**
Hematocrit (%)		46.5	50.2	48.7	52.8	49.7*	57.5**	51.7**	57.8**
Mean corpuscular volume (fL)		55.7	59.4	-	-	-	-	54.1	56.6*
Red cell distribution width (%)		12.9	12.6	-	-	-	-	14.3**	13.6**
Mean corpuscular hemoglobin (pg)		17	18.5	-	-	-	17.6*	16.4	17.4**
Platelets (10^3/µL)		997	980	-	-	730**	-	711**	731**
White blood cells (10^3/µL)		14.08	-	-	-	18.06*	-	17.76*	-
Lymphocytes (10^3/µL)		11.23	-	-	-	14.98**	-	14.61*	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals		**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Serum chemistry (PND 105)	No. evaluated	10	10	10	10	10	8	10	10
Albumin (g/dL)		3.9	-	-	-	3.7*	-	3.7**	-
Total protein (g/dL)		6.6	-	-	-	6.3	-	6.1**	-
Urea nitrogen (mg/dL)		13.4	12.8	-	-	-	-	20.0**	15.3**
Creatinine (mg/dL)		0.32	-	-	-	-	-	0.42**	-
Urine parameters (PND 105)	No. evaluated	10	10	10	10	10	10	10	9
Urinalysis [f]									
Microalbumin/creatinine (mg/g)		112.5	31.5	-	-	429.6	187	2907.2**	1081.9**
Urinary biomarkers									
TIM-1		0.34	0.23	0.40	0.68	0.78	0.40	2.09*	0.44
Lipocalin-2		141	95.8	186	310	272	145	456	166
Bone Densitometry (PND 105)	No. evaluated	10	10	10	10	10	10	9	10
Left distal femur – metaphysis site									
Bone mineral content (total) (mg/mm)		-	-	-	-	-	-	-	-
Bone area (mm^2)		25.395	15.482	-	17.058	27.069	17.636*	28.440*	17.356
Bone mineral density (mg/cm^3)		564.57	668.62	-	629.63*	498.45***	613.77**	449.16***	588.88***
Left femur – diaphysis site									
Bone mineral content (cortical) (mg/mm)		11.807	-	-	-	-	-	10.539*	-
Cortical thickness (mm)		0.8429	0.7011	-	-	-	-	0.7376***	0.6900
Bone mineral density (cortical) (mg/cm^3)		1286.75	1272.1	-	-	1264.20*	-	1233.28***	1251.63*
Gross pathology (PND 105)	No. evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)	**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Adrenal glands								
Enlarged	-	1	-	-	-	2	-	-
Mottled	-	0	-	-	-	1	-	-
Firm	-	0	-	-	-	1	-	-
Yellow area(s)	-	0	-	-	-	-	-	1
Paws								
Swollen	0	-	-	-	-		1	-
Organ weights (%) [c]								
Heart								
Absolute	1.87 g	1.08 g	−19.8**	−9.3*	−27.3**	−16.7**	−26.2**	−24.1**
Relative to body weight	0.328 g/100 g	0.376 g/100 g	−20.7**	−15.0**	−24.1**	−20.2**	−18.3**	−24.5**
Relative to brain weight	85.571 g/100 g	54.532 g/100 g	−18.9**	−6.6	−24.8**	−14.1**	−22.7**	−22.9**
Kidneys								
Relative to body weight	-	0.79 g/100 g	-	−7.2*	-	−12.3**	-	−10.0**
Liver								
Relative to body weight	-	3.21 g/100 g	-	-	-	-	-	−10.6*
Histopathology								
Adrenal cortex								

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Congestion/hemorrhage								
Minimal	-	1	-	2	-	2	-	8
Mild	-	0	-	1	-	1	-	-
Necrosis, coagulative [g]								
Mild	-	0	-	1	-	-	-	-
Severe	-	0	-	-	-	1	-	1
Fibroplasia/Fibrosis								
Minimal	-	0	-	1	-	-	-	-
Mild	-	0	-	-	-	-	-	1
Adrenal medulla								
Necrosis, coagulative [g]								
Severe	-	0	-	-	-	1	-	1
Kidney								
Glomerulonephritis, membranoproliferative								
Minimal	3	0	5	4	1	7	2	2
Mild	0	0	-	-	8	-	7	6
Moderate	0	0	1	-	-	-	1	2
Atrophy/hypoplasia, tubule, medulla								
Minimal	0	0	-	-	3	3	2	3
Mild	0	0	-	-	1	-	5	3
Moderate	0	0	-	-	-	-	1	2

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Dilation, tubule, medulla								
Minimal	1	0	-	-	-	-	6	3
Mild	1	-	-	-	-	-	-	-
Mineralization, tubule, cortex								
Minimal	7	1	-	-	9	8	9	8
Mild	0	0	-	-	-	-	1	1
Nephropathy, chronic progressive								
Minimal	8	1	-	-	8	6	3	6
Mild	0	-	-	-	2	-	5	-
Moderate	0	-	-	-	-	-	2	-
Stomach, glandular								
Mineralization, mucosal								
Minimal	3	0	-	-	5	4	6	9
Mild	0	-	-	-	1	-	3	-
Paw No. evaluated	0	0	0	0	0	0	1	0
Fibrosis, moderate	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Inflammation, chronic, minimal	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Metaplasia, cartilaginous, mild	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Periosteal new bone formation, mild	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA
Lymphocytic leukemia	0	-	-	-	-	-	1 [i]	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals		**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Recovery period (Subset 2) [a]	No. evaluated	21	21	20	21	20	21	19	19
Noteworthy findings:									
No. died or sacrificed moribund		2	0	0	0	0	0	2 [i]	0
Clinical observations [b]									
Impaired use of hindlimb(s)		0/0	0/0	-	2/1	2/1	-	28/5	4/3
Swollen hindlimb(s)		0/0	0/0	3/1	-	8/1	-	55/4	17/3
Body weight (%) [b]	PND 105	596 g	-	-	-	-	-	−5.5	-
Food consumption (%)		-	-	-	-	-	-	-	-
Gestation parameters	No. evaluated	0	19	0	17	0	13	0	12
Body weight (%)		NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Food consumption		NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Functional observational battery	No. evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
		-	-	-	-	-	-	-	-
Estrous cycle length (days)	No. evaluated	0	17	0	19	0	20	0	17
		NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
Reproductive performance	No. evaluated	21	22	20	22	20	22	19	22
Mating index (%)		90.0	95.2	-	85.7	80.0	85.7	82.4	78.9
Fertility index (%)		-	90.5	-	-	-	61.9	-	63.2
Conception index (%)		NA	95.0	NA	-	NA	72.2	NA	80.0
Pre-coital interval (day)	No. evaluated	0	20	0	18	0	18	0	15
		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals		**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Hematology (PND 233/GD 15)	No. evaluated	10	10	10	9	10	6	10	10
Red blood cells (10^6/µL)		8.5	-	-	-	-	-	7.41**	-
Hemoglobin (g/dL)		14.6	-	-	-	-	-	13.0**	-
Hematocrit (%)		47.8	-	-	-	-	-	42.4**	-
Serum chemistry (PND 233/GD 15)	No. evaluated	10	10	10	10	10	6	10	10
Albumin (g/dL)		3.9	-	-	-	3.7	-	3.7**	-
Total protein (g/dL)		6.8	-	-	-	6.5	-	6.4*	-
Urinalysis (PND 233/GD15) [f]	No. evaluated	10	9	10	9	10	6	10	10
Microalbumin/creatinine (mg/g)		1336.3	287.7	-	-	2279.3	261.8	2147	1268.8
Urinary biomarkers (PND 233/GD 15)	No. evaluated	10	10	10	9	10	10	10	10
TIM-1		1.02	-	-	-	-	-	1.66	-
Bone Densitometry (PND 233/GD 15)	No. evaluated	10	10	10	9	10	10	10	10
Left distal femur – metaphysis site									
Bone mineral content (total) (mg/mm)		15.574	-	-	-	-	-	14.433	-
Bone area (mm^2)		-	-	-	-	-	-	-	-
Bone mineral density (mg/cm^3)		626.73	729.85	-	688.57	-	694.68	579.10*	661.87*
Left femur – diaphysis site									
Bone mineral content (cortical) (mg/mm)		15.963	10.2	-	-	-	-	14.929	9.904
Cortical thickness (mm)		0.9963	0.8223	-	-	-	-	0.9059**	0.7503***
Bone mineral density (cortical) (mg/cm^3)		1364.85	1341.24	-	-	-	-	1344.33**	1310.05***

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)		**0 (Control)**		**1**		**3**		**10**	
Number of Animals		**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Gross pathology	No. evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Adrenal glands									
Mass		-	0	-	-	-	-	-	1
Dark red area(s)		-	0	-	-	-	1	-	-
Organ weights	No. evaluated	10	10	10	10	10	6	10	10
		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	No. evaluated	10	10	10	10	10	10	10	10
Adrenal cortex									
Congestion/hemorrhage									
Minimal		-	0	-	5	-	2	-	4
Mild		-	0	-	2	-	-	-	-
Moderate		-	0	-	-	-	1	-	1
Necrosis, coagulative									
Moderate		-	0	-	1	-	-	-	-
Severe		-	0	-	-	-	-	-	1
Fibroplasia/fibrosis									
Minimal		-	0	-	-	-	-	-	2
Mild		-	0	-	1	-	-	-	-
Adrenal medulla									
Necrosis, coagulative									
Mild		-	0	-	-	-	-	-	1

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Kidney								
Glomerulonephritis, membranoproliferative								
Minimal	2	2	8	6	2	5	3	6
Mild	0	0	2	1	8	5	7	1
Atrophy/hypoplasia, tubule, medulla								
Minimal	0	-	2	-	2	-	1	-
Mild	0	-	-	-	-	-	4	-
Moderate	0	0	-	-	-	-	4	1
Dilation, tubule, medulla								
Minimal	1	0	-	-	-	2	2	1
Mild	0	-	-	-	-	-	1	-
Mineralization, tubule, cortex								
Minimal	3	0	6	2	9	8	10	5
Nephropathy, chronic progressive								
Minimal	8	-	-	-	6	-	3	-
Mild	1	-	-	-	3	-	6	-
Moderate	1	-	-	-	1	-	1	-
Stomach, glandular								
Mineralization, mucosal								
Minimal	0	0	4	-	7	2	7	5
Mild	0	-	-	-	-	-	2	-

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

Table 2.6.7.15B: Juvenile (Dose-range Finding) Toxicity Study in Rats (Continued) Study No. [redacted]-961003

Dose (mg/kg/dose)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**	**M: 52**	**F: 52**
Immunophenotyping phase (Subset 4) [a]								
Noteworthy findings: No. evaluated (Main)	10	10	10	10	10	10	10	10
No. died or sacrificed moribund	0	0	2	0	0	0	1	1
T cell-dependent antibody response [h] (PND 85 or 100)								
Anti-KLH IgG (µg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-KLH IgM (µg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-
Peripheral blood immunophenotyping (PND 100)								
CD45+ lymphocytes (10^6/mL)	9.66	8.97	-	-	14.93*	13.62*	18.38*	15.00*
NK cells (CD3-, CD16a+) (10^6/mL)	0.69	0.57	-	-	0.93*	0.84*	1.18*	1.04*
B cells (CD3-, CD45RA+) (10^6/mL)	3.82	3.57	-	-	6.62*	5.78*	8.31*	6.97*
Total T cells (CD3+) (10^6/mL)	4.03	4.12	-	-	5.64	5.7	6.85*	5.71
T helper (CD3+, CD4+) (10^6/mL)	2.85	2.88	-	-	3.94	4.05	4.71*	3.99
T cytotoxic (CD3+, CD8+) (10^6/mL)	0.93	1.01	-	-	1.31	1.27	1.71*	1.31
Noteworthy findings: No. evaluated (Recovery)	10	10	8	10	9	10	10	8
No. found dead/sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	1 [i]
T cell-dependent antibody response [h] (PND 271 or 232)	-	-	-	-	-	-	-	-
Peripheral blood immunophenotyping (PND 231/232)	-	-	-	-	-	-	-	-

[a] 10 rats/sex/group were assigned to Subset 1 (necropsied at the end of dosing period), 22 rats/sex/group were assigned to Subset 2 (recovery group), 15 rats//sex/group (control group) and 42 rats//sex/group (treatment group) were assigned to Subset 3 (toxicokinetics and ADA assessment group), and 20 rats/sex/group were assigned to Subset 4 (immune assessment group).

[b] No. positive post-dose/total no. evaluated

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

[c] Incidence/no. of affected animals

[d] For controls, group means are shown. For treated groups, the percent difference from controls is presented. Statistical significance is based on the absolute values (not on the percent difference).

[e] Data are reported for PND 38-42, however, food consumption for males dosed at 10 mg/kg was slightly reduced from PND 38 to PND 91, reaching statistical significance on 2 occasions.

[f] Higher positive urine protein reaction was noted in males at ≥ 3 mg/kg and females at ≥ 1 mg/kg. This persisted at ≥ 3 mg/kg during the recovery period.

[g] Often with dystrophic mineralization.

[h] Animals received a 0.3 mg intravenous injection of keyhole limpet hemocyanin (KLH) on PND 79. A subset of animals designated for the recovery phase received an intravenous injection of 0.3 mg KLH on PND 211.

[i] Three distinct hematopoietic neoplasms were noted in three 10 mg/kg group animals: lymphocytic leukemia in a male at the primary necropsy on PND 105; granulocytic leukemia in a male euthanized in extremis on PND 182; and lymphoma in a female euthanized in extremis on PND 178.

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC(0-336h) = area under the serum concentration curve from the time of dosing (time 0) to 336 hours postdose; Cmax = maximum serum concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; No. = number; PND = postnatal day; Q2W = once every 2 weeks; - = no noteworthy findings; * = $p \leq 0.05$ statistically significant compared to control group value; ** = $p \leq 0.01$ statistically significant compared to control group value; *** = $p \leq 0.001$ statistically significant compared to control group value.

Approved v1.0

16 局所刺激性試験

該当なし。

17 その他の毒性試験

Table 2.6.7.17: Other Toxicity Studies: Renal Toxicity Study in the 5/6 Nephrectomy or Unilateral Ureter Ligation model

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study No.
Rat/ Crl:CD Sprague Dawley	Subcutaneous injection	13 weeks Q2W	0, 0.5 or 5 (luspatercept) and 10 (RAP-536)	Sham surgical procedure (both surgeries): 3F 5/6 nephrectomy: 6F (surgery performed during Week 3) Unilateral ureter ligation (UUL): 6F (surgery performed during Week 11)	**Clinical pathology and urinary biomarkers** **5/6 nephrectomy:** Slight ↑ RBC, HGB, and HCT with all doses of luspatercept or RAP-536 (more robust ↑than UUL); Persistent ↑ serum CREA, ↑ BUN, ↑ urine volume, ↑ lipocalin-2, all groups with no additional test article-related effect; ↑ urinary ALB in all groups, with higher increases in luspatercept or RAP-536-treated groups; ↑ urinary TIM-1 (5 mg/kg luspatercept) and osteopontin (5 mg/kg luspatercept and 10 mg/kg RAP-536). **UUL:** Slight ↑ RBC, HGB, and HCT (5 mg/kg luspatercept and 10 mg/kg RAP-536); ↑ urinary TIM 1, all groups with no additional test article related effects. ↑ lipocalin-2 in all groups, with minimal increases in luspatercept or RAP 536-treated groups compared to vehicle treatment. **Histopathology** **5/6 nephrectomy, vehicle treatment:** Min to mild glomerular changes (hypertrophy, ↑ cellularity and mesangial matrix, visceral epithelial hypertrophy/hyperplasia and mesangiolysis), minimal to mild cortical tubular dilation, and associated ↑ glomerular (pSmad2, aSMA), tubular (pSmad2) and tubulointerstitial (aSMA) immunostaining. **Sham operated groups (either 5/6 nephrectomy or UUL arm), test article-treated:** Glomerular changes (minimal ↑ in pSmad2 and aSMA immunostaining) similar to 5/6 nephrectomy vehicle-treated group. Minimal to mild	CC-DISC-TOX-2024

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; ALB = albumin; BUN = blood urea nitrogen; CREA = creatinine; F = female; HCT = hematocrit; HGB = hemoglobin; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; RBC = red blood cells; UUL = unilateral ureter ligation; ↑ = increase; + = positive; − = negative.

Approved v1.0

Table 2.6.7.17: Other Toxicity Studies (Continued)

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study No.
Rat/ Crl:CD Sprague Dawley					↑ tubulointerstitial aSMA immunostaining with luspatercept (0.5 and 5 mg/kg). **5/6 nephrectomy, test article treated:** Compared with vehicle treated nephrectomized, or luspatercept/RAP-treated, sham operated controls, similar but more severe spectrum of glomerular changes was seen. Additional glomerular changes of hyaline accumulation, epithelial crescent formation, ↑ thickness of Bowman's capsule, dilation of Bowman's space and/or glomerular atrophy; ↑ incidence and/or severity of tubulointerstitial lesions (tubular dilation and/or basophilia, interstitial fibroplasias/fibrosis and/or mononuclear inflammatory cell infiltrates), and ↑ glomerular and tubulointerstitial immunostaining for pSmad2 and aSMA were noted. **UUL:** Kidneys with ureteral obstruction were characteristic of obstructive nephropathy and there was no notable difference in the severity of obstructive nephropathy between vehicle and treatment groups. **Toxicokinetic Bioanalysis** Increases in drug concentrations were approximately dose proportional between 0.5 and 5 mg/kg luspatercept. ADA were detected in Day 92 samples from animals dosed with each drug. 25% of luspatercept-treated animals, and 33% of RAP 536-treated animals were ADA+. In ADA− animals, post-last dose drug concentrations (4h post-last dose) were 2 to 10 fold higher than post-first dose (4 h postdose	CC-DISC-TOX-2024 (Continued)

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; ALB = albumin; BUN = blood urea nitrogen; CREA = creatinine; F = female; HCT = hematocrit; HGB = hemoglobin; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; RBC = red blood cells; UUL = unilateral ureter ligation; ↑ = increase; + = positive; − = negative.

Approved v1.0

Table 2.6.7.17: Other Toxicity Studies (Continued)

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study No.
					1). Drug concentrations in post-last dose samples were reduced in most (but not all) ADA+ animals vs ADA− animals, indicating loss of exposure due to immunogenicity.	

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; ALB = albumin; BUN = blood urea nitrogen; CREA = creatinine; F = female; HCT = hematocrit; HGB = hemoglobin; No. = number; Q2W = once every 2 weeks; RBC = red blood cells; UUL = unilateral ureter ligation; ↑ = increase; + = positive; − = negative.

Approved v1.0