目次

略号及び用語の定義
2.6.1　緒言

略号及び用語の定義

略号	定義	
ACE-011	Sotatercept or MK-7962	別名：sotatercept、MK-7962
ActRIIA	Activin receptor type IIA	アクチビン受容体 IIA 型
ALK	Activin receptor-like kinase	アクチビン受容体様キナーゼ
BMP	Bone morphogenetic protein	骨形成蛋白質
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor 2	II 型骨形成蛋白質受容体
Fc	Fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
GDF	Growth and differentiation factor	成長分化因子
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
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
MK-7962	Sotatercept or ACE-011	別名：sotatercept、ACE-011
PAH	Pulmonary arterial hypertension	肺動脈性肺高血圧症
RAP-011	A murine version of sotatercept	Sotatercept のマウス相同分子
Smad	Mothers against decapentaplegic, a group of related intracellular proteins critical for transmitting to the nucleus signals from the TGF-β superfamily at the cell surface	
TGF-β	Transforming growth factor-β	形質転換成長因子 β
WHO	World Health Organization	世界保健機関

2.6.1　緒言

Sotatercept（別名：MK-7962、ACE-011）はヒト ActRIIA の細胞外領域とヒト免疫グロブリン G1（IgG1）の Fc 領域の遺伝子組換え融合蛋白質であり、WHO 分類第1群である肺動脈性肺高血圧症（PAH）の成人患者を対象とした治療薬である。

Sotatercept の作用機序は相反する Smad2/3及び Smad1/5/8の細胞内シグナル伝達経路のバランスを回復させることにある。Sotatercept は ActRIIA の可溶型として機能し、アクチビン A、アクチビン B、GDF11、GDF8、BMP10等の ActRIIA に結合する TGF-β ファミリーリガンドを捕捉し、ActRIIA への結合及び下流の Smad2/3シグナルの誘導を阻害する。PAH の病態では、肺血管内皮細胞での BMPR2の機能喪失型変異又は Smad1/5/8シグナル伝達に影響を及ぼす要因（例えば ActRIIA/ALK 経路の活性化）により Smad1/5/8シグナル伝達の不全がみられ、血管平滑筋細胞の過剰な増殖が誘導される。Sotatercept は Smad2/3のシグナル経路の阻害により、相反する Smad 経路のバランスを正常化し、その結果、平滑筋細胞の増殖の恒常性を回復させる。

Sotatercept はヒトアクチビン A、アクチビン B、GDF11及び BMP10に結合する。Sotatercept のマウス相同分子である RAP-011は肺血管細胞増殖を抑制し、薬物誘発性及び遺伝性 PAH モデル等の PAH の動物モデルで肺血管のリモデリングを阻害した。

ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いて薬物動態及び毒性試験を実施した。マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルでは ActRIIA の標的リガンド（アクチビン A、アクチビン B、GDF8、GDF11及び BMP10）の配列一致率が97%以上で保存されており、また、ラット、カニクイザル及びヒトでの薬理学的反応性（アクチビン A 及び GDF11の阻害による赤血球系パラメータの増加）、並びにこれらの動物種における許容可能な薬物動態プロファイルに基づき、これらの動物種は毒性評価に適しているものと判断した。Sotatercept の非臨床安全性については、ラット及びサルを用いたそれぞれ最長3ヵ月間及び9ヵ月間の GLP 適用反復投与毒性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、並びにラットを用いた幼若動物毒性試験で確認されている。

非臨床薬理、安全性薬理、薬物動態及び毒性試験の成績を各2.6項に記載した。

目次

表一覧
図一覧
略号及び用語の定義
2.6.2 薬理試験の概要文
2.6.2.1 まとめ
2.6.2.2 効力を裏付ける試験
2.6.2.2.1 In vitro での効力を裏付ける試験
2.6.2.2.1.1 作用機序
2.6.2.2.1.2 動物種間でのアミノ酸配列の一致性
2.6.2.2.1.3 TGF-β ファミリーリガンドに対する sotatercept の in vitro での結合親和性及びシグナル伝達阻害
2.6.2.2.2 In vivo での効力を裏付ける試験
2.6.2.2.2.1 マウスの相同分子 RAP-011
2.6.2.2.2.2 モノクロタリン及び Sugen-hypoxia 誘発ラット肺動脈性肺高血圧症モデルでの RAP-011の効果
2.6.2.2.2.3 Sugen-hypoxia-normoxia 誘発ラット肺動脈性肺高血圧症モデルでの RAP-011の治療効果
2.6.2.2.2.4 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウス肺動脈性肺高血圧症モデルでの RAP-011の効果
2.6.2.2.2.5 マウス肺動脈絞扼術誘発右心不全モデルでの RAP-011の効果
2.6.2.3 副次的薬理試験
2.6.2.4 安全性薬理試験
2.6.2.4.1 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する sotatercept の影響（TT #[redacted]-7806）
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験
2.6.2.6 考察及び結論
2.6.2.7 図表
2.6.2.8 参考文献

表一覧

表 2.6.2-1 表面プラズモン共鳴法での sotatercept とヒト TGF-β リガンドの結合親和性
表 2.6.2-2 レポーター遺伝子を導入した細胞培養系でのヒトリガンドによるシグナル伝達に対する sotatercept の阻害－1
表 2.6.2-3 レポーター遺伝子を導入した細胞培養系でのヒトリガンドによるシグナル伝達に対する sotatercept の阻害－2
表 2.6.2-4 TT #[redacted]-7833の TK データに基づくラットを用いた PD004試験における RAP-011 の推定血清中 PK パラメータ

図一覧

図 2.6.2-1 PAH での sotatercept の作用点
図 2.6.2-2 モノクロタリン誘発ラット PAH モデルでの平均肺動脈圧及び右室肥大に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-3 モノクロタリン誘発ラット PAH モデルでの肺血管のリモデリングに及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-4 モノクロタリン誘発ラット PAH モデルの肺での CD11b 陽性マクロファージの浸潤に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-5 SuHx 誘発ラット PAH モデルでの平均肺動脈圧及び右室肥大に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-6 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの右室収縮期圧及び全肺抵抗係数に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-7 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの肺血管のリモデリングに及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-8 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの右室肥大及び右室壁厚に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-9 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの右室機能に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-10 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの RAP-011の治療投与終了後の右室収縮期圧及び全肺抵抗係数に及ぼす効果の持続性
図 2.6.2-11 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの RAP-011の治療投与終了後の右室機能に及ぼす効果の持続性
図 2.6.2-12 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの RAP-011の治療投与終了後の右室肥大に及ぼす効果の持続性
図 2.6.2-13 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウス PAH モデルでの右室収縮期圧及び右室肥大に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-14 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウス PAH モデルでの右室機能に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-15 マウス肺動脈絞扼術モデルでの右室最大収縮期圧に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-16 マウス肺動脈絞扼術モデルでの三尖弁輪収縮期移動距離に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-17 マウス肺動脈絞扼術モデルでの右室肥大及び右室壁厚に及ぼす RAP-011の影響
図 2.6.2-18 マウス肺動脈絞扼術モデルの右室でのコラーゲン量に及ぼす RAP-011の影響

略号及び用語の定義

略号	定義	
ACE-011	Sotatercept or MK-7962	別名：sotatercept、MK-7962
ActRIIA	Activin receptor Type IIA	アクチビン受容体 IIA 型
ALK	Activin receptor-like kinase	アクチビン受容体様キナーゼ
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
BMP	Bone morphogenetic protein	骨形成蛋白質
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor 2	II 型骨形成蛋白質受容体
C_{max}	observed maximum concentration	見かけの最高濃度
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
Erk1/2	Extracellular signal-regulated protein kinase 1 and 2	
ET-1	Endothelin-1	エンドセリン 1
Fc	Fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
GDF	Growth and differentiation factor	成長分化因子
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
hERG	human ether-à go-go related gene	ヒト ether-à go-go 関連遺伝子
IC_{50}	Half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
JNK	c-Jun N-terminal kinase	
M	Molar	モル濃度
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	
MK-7962	Sotatercept or ACE-011	別名：sotatercept、ACE-011
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
n	Number	
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PAB	Pulmonary artery banding	肺動脈絞扼術
PAH	Pulmonary arterial hypertension	肺動脈性肺高血圧症
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	
RAP-011	A murine version of sotatercept	Sotatercept のマウス相同分子
Rho	Rho homologous	
Smad	Mothers against decapentaplegic, a group of related intracellular proteins critical for transmitting to the nucleus signals from the TGF-β superfamily at the cell surface	
Sugen5416	Vascular endothelial growth factor receptor antagonist	血管内皮増殖因子受容体拮抗薬
SuHx	Sugen-hypoxia	
SuHxNx	Sugen-hypoxia-normoxia	

略号	定義	
TGF-β	Transforming growth factor-β	形質転換成長因子 β
TGFβRII-Fc	Transforming growth factor-β receptor type II fused to an Fc	
WHO	World Health Organization	世界保健機関

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

Sotatercept（別名：MK-7962、ACE-011）はヒト ActRIIA の細胞外領域とヒト免疫グロブリン G1（IgG1）の Fc 領域の遺伝子組換え融合蛋白質であり、WHO 分類第1群である肺動脈性肺高血圧症（PAH）の成人患者に対する治療薬として現在開発中のアクチビンシグナル伝達阻害薬である。

Sotatercept の作用機序は相反する Smad2/3及び Smad1/5/8の細胞内シグナル伝達経路のバランスを回復させることにある。Sotatercept は ActRIIA の可溶型として機能し、アクチビン A、アクチビン B、GDF11、GDF8、BMP10等の ActRIIA に結合する TGF-β ファミリーリガンドを捕捉し、ActRIIA への結合及び下流の Smad2/3シグナルの誘導を阻害する。PAH の病態では、肺血管内皮細胞での BMPR2の機能喪失型変異又は Smad1/5/8シグナル伝達に影響を及ぼす要因（例えば ActRIIA/ALK 経路の活性化）により Smad1/5/8シグナル伝達の不全がみられ、血管平滑筋細胞の過剰な増殖が誘導される。Sotatercept は Smad2/3のシグナル経路の阻害により、相反する Smad 経路のバランスを正常化し、その結果、平滑筋細胞の増殖の恒常性を回復させる。

In vitro での非臨床薬理試験の結果、sotatercept はヒトアクチビン A、アクチビン B、GDF11及び BMP10に高親和性を示した。Sotatercept はレポーター遺伝子を導入した細胞培養系でリガンドによる ActRIIA のシグナル伝達を阻害した。

Sotatercept のマウス相同分子である RAP-011を用いて、in vivo での非臨床薬理試験を実施した。RAP-011は sotatercept のヒト IgG1 Fc をマウス IgG2a Fc に置換した分子である。ActRIIA の細胞外領域のアミノ酸配列及び構造は sotatercept 及び RAP-011では一致している。

PAH のげっ歯類モデルである、モノクロタリン誘発疾患モデル及び血管内皮増殖因子受容体拮抗薬（Sugen5416）を併用した低酸素誘発疾患モデルで、RAP-011は PAH の疾患の進行を抑制する効果を示した。RAP-011は予防及び治療投与で、肺血管及び心臓のリモデリング、並びに血行動態の測定値に長期的な改善を示し、RAP-011の改善効果は投与終了後も持続又は持続する傾向がみられた。

Sotatercept を用いた in vitro hERG 試験を実施した。また、ICH S6(R1)ガイドラインに従い、サルを用いた GLP 適用慢性毒性試験において安全性薬理評価（神経学的検査、体温、呼吸数、心電図及び血圧測定）を実施した。

非臨床薬理試験の一覧を[2.6.3.1 項]に記載した。

非臨床薬理試験の成績から、WHO 分類第1群である PAH の成人患者の sotatercept による治療が支持されるものと考えられる。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro での効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1.1 作用機序

2.6.2.2.1.1.1 肺動脈性肺高血圧症での TGF-β シグナルの関与

TGF-β ファミリーは種々の細胞の分化・増殖、代謝、運動能、浸潤能、生存、細胞外マトリックスの産生等に関与している[4.3: 07ZKXB]。これまでに、TGF-β リガンドとして TGF-β アイソフォーム、アクチビン、GDF、インヒビン、nodal、抗ミュラー管ホルモン、BMP 等の33種類が同定されている[4.3: 080S5Z]。TGF-β リガンドの一部はプロセシング（切断）を受けて活性化する。活性化後、TGF-β リガンドはセリン／スレオニン、チロシンキナーゼ活性を有する I 型及び II 型受容体の各2分子からなるヘテロ4量体の特定の組合せと結合する。リガンドが受容体に結合すると、I 型受容体が II 型受容体によりリン酸化され、I 型受容体のリン酸化能が活性化される。このリン酸化により、Smad 経路及び non-Smad 経路に分類される細胞内シグナルが誘導される。Smad 経路では転写因子である特異型 Smad（receptor-regulated Smad）がリン酸化され、non-Smad 経路では p38 MAPK、Erk1/2、JNK、PI3K、Rho GTPase 等の複数のキナーゼがリン酸化され、その結果遺伝子の転写が誘導される[4.3: 080RX7]。

内皮細胞では、リガンドであるアクチビン、GDF 及び TGF-β により活性化 I 型受容体（ALK4/5/7）が Smad2/3をリン酸化し、BMP により活性化 I 型受容体（ALK1/2/3/6）が Smad1/5/8をリン酸化する。その後、Smad2/3又は Smad1/5/8は共有型 Smad（Smad4）と複合体を形成し、核内に取り込まれ DNA に結合する。このように内皮細胞は増殖促進性（アクチビン/TGF-β-Smad2/3）及び増殖抑制性（BMP-Smad1/5/8）のシグナルを同時に受けており、血管系で生じる力学的な作用の影響も受ける。

Smad2/3を介してシグナルを伝達する TGF-β ファミリーの一群は、血管細胞の増殖を誘導することにより、肺動脈及び心室動脈のリモデリングをもたらす。また、TGF-β1は non-Smad 経路である PI3K/AKT 経路の活性化を通じて肺動脈由来の平滑筋細胞のアポトーシスを抑制し、肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進することが示されている[4.3: 080RWV][4.3: 080RWP]。TGF-β1が肺動脈の狭窄に直接関与することは、モノクロタリン及び Sugen-hypoxia 誘発肺動脈性肺高血圧症（PAH）動物モデルで TGF-β1及び TGF-β3を捕捉する遺伝子組換え細胞外領域融合蛋白質（TGFβRII-Fc）を用いて示されている[4.3: 080SJG]。本モデルでは、TGFβRII-Fc は Smad2/3シグナル伝達を阻害することにより、血管のリモデリングの抑制とともに、右室肥大の進展を抑制した。同様の知見は、抗 TGF-β 受容体抗体及び抗 TGF-β 抗体でも報告されている[4.3: 080SHP][4.3: 080SHN]。Marfan 症候群及び Loeys-Dietz 症候群の心血管症状では、TGF-β シグナル伝達の異常が報告されている[4.3: 080SHZ]。

アクチビン A 及び GDF11は Smad2/3シグナル伝達を誘導し、細胞の増殖を促進する。PAH 患者及び PAH の疾患動物モデルで、肺病変部でのアクチビン A 及び GDF11の発現の上昇、並びにアクチビン A の血中濃度の上昇が認められている[4.2.1.1.1: 080ZZX]。肺ではアクチビン A は主に気

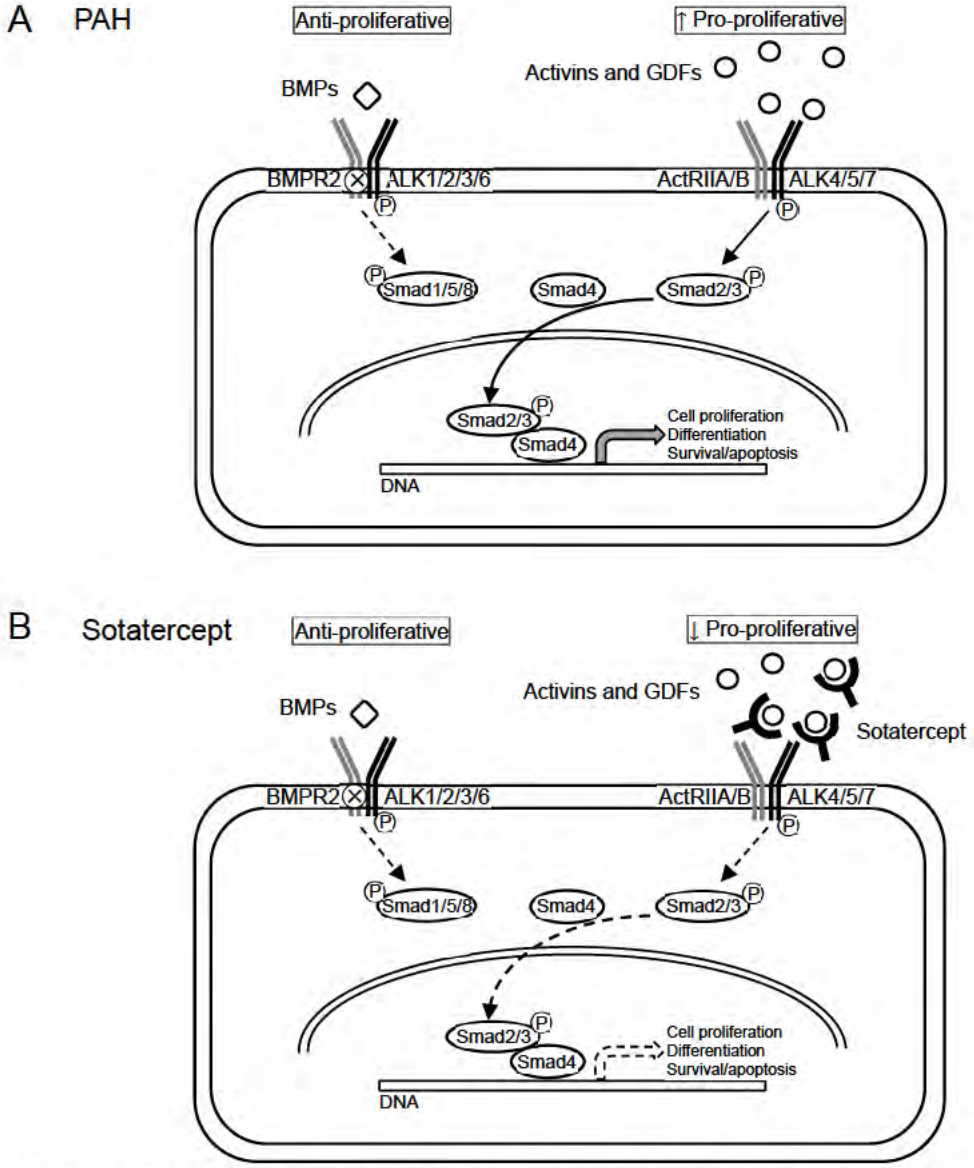
管支上皮細胞及びマクロファージに局在し、平滑筋細胞の増殖を誘導し、PAH の主要な調節因子である ET-1の発現を増強することが報告されている[4.3: 080S5X][4.3: 080S5S][4.3: 080SJC]。アクチビン A は平滑筋細胞の増殖を促進するとともに、PAH 患者の平滑筋細胞ではアクチビン A の産生が亢進しており、増殖の局所的な供給ループを形成している。GDF11の PAH への関与は内皮細胞に限定されていることから、選択的に阻害することにより PAH の動物モデルでは予防的に働くことが示されている[4.3: 080SJF]。

BMP シグナル伝達の低下が PAH の発症に関与することが示されている[4.3: 080SJB]。肺血管の構造と機能の重要な調節因子である肺血管内皮細胞での BMPR2シグナルの制御異常により、血管平滑筋細胞の分化と増殖が誘導され、PAH の特徴である肺血管のリモデリングが引き起こされることが報告されている。BMPR2の機能喪失型変異と PAH の発症の関連性から、疾患での BMP シグナル経路の関与が示唆される[4.3: 080RWN][4.3: 080KPW]。また、BMPR2の変異がない家族性及び特発性 PAH では BMPR2の蛋白質の発現量の低下が認められている[4.3: 080KQ0]。さらにアクチビン/GDF と BMP のシグナル伝達経路の不均衡が PAH の主要な原因であることを示唆する報告がある[4.2.1.1.1: 080ZZX]。

2.6.2.2.1.1.2 Sotatercept の作用機序

Sotatercept はアクチビンシグナル伝達阻害薬である。その作用機序は、相反する Smad2/3及び Smad1/5/8の細胞内シグナル伝達経路のバランスを回復させることにある。Sotatercept は ActRIIA の可溶型として機能し、アクチビン A、アクチビン B、GDF11、GDF8、BMP10等の ActRIIA に結合する TGF-β ファミリーリガンドを捕捉し、ActRIIA への結合及び下流の Smad2/3シグナルの誘導を阻害する[2.6.2.2.1.3 項]。PAH の病態では、肺血管内皮細胞での BMPR2の機能喪失型変異又は Smad1/5/8シグナル伝達に影響を及ぼす要因（例えば ActRII2A/ALK4/5/7経路の活性化）により Smad1/5/8シグナル伝達の不全がみられ、血管細胞の過剰な増殖が誘導される。Sotatercept は Smad2/3のシグナル経路の阻害により、相反する Smad 経路のバランスを正常化し、その結果、血管細胞の増殖の恒常性を回復させると考えられる[図 2.6.2-1]。

図 2.6.2-1　　PAH での sotatercept の作用点



ActRIIA：アクチビン受容体 IIA 型、ALK：アクチビン受容体様キナーゼ、BMP：骨形成蛋白質、BMPR2：II 型骨形成蛋白質受容体、DNA：デオキシリボ核酸、GDF：成長分化因子、P：リン酸化、PAH：肺動脈性肺高血圧症

リガンドが受容体に結合すると、活性化された受容体により Smad2/3又は Smad1/5/8がリン酸化され、Smad4と複合体を形成して核内に移行する。核内に移行した Smad 複合体は標的遺伝子の発現を調節する。Sotatercept の作用機序は増殖促進シグナルと増殖抑制シグナルのバランスの正常化であると推定される。PAH では肺血管平滑筋及び内皮細胞での BMPR2-Smad1/5/8経路の制御異常が関与しており、増殖促進シグナル伝達と増殖抑制シグナル伝達の不均衡が報告されている。BMPR2-Smad1/5/8経路のダウンレギュレーションにより、増殖抑制シグナルが減少した結果、バランスが増殖促進性のアクチビン-Smad2/3シグナルにシフトし、肺血管のリモデリングが引き起こされる。Sotatercept は過剰な ActRIIA リガンドを捕捉することにより、ActRIIA-Smad2/3シグナルを減少させ、増殖促進シグナルと増殖抑制シグナルのバランスを調整すると考えられる。

[4.3: 07YQ8J]の Figure 1を変更して示した。

2.6.2.2.1.2 動物種間でのアミノ酸配列の一致性

ActRIIA の細胞外領域のアミノ酸配列及び構造は sotatercept 及び RAP-011では同一である[2.6.2.2.2.1 項]。げっ歯類、カニクイザル及びヒト間の標的リガンドのアミノ酸配列の比較では、アクチビン A 及び GDF11については100%の一致率を示し、アクチビン B 及び BMP10については97%～98%の一致率を示した[4.2.1.1.2: PD008]。

2.6.2.2.1.3 TGF-β ファミリーリガンドに対する sotatercept の in vitro での結合親和性及びシグナル伝達阻害

Sotatercept の結合特異性について、表面プラズモン共鳴法、並びに Smad2/3及び Smad1/5/8のシグナル伝達経路応答性のレポーター遺伝子を導入した細胞培養系を用いて検討した[4.2.1.1.3: PD001][4.2.1.1.4: PD002]。表面プラズモン共鳴法での sotatercept と各種ヒトリガンドの結合親和性（K_D 値）を[表 2.6.2-1]に、ルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子を導入した細胞培養系で、ヒトリガンドにより誘導されるシグナル伝達に対する sotatercept の阻害作用（IC_{50}値）を[表 2.6.2-2]に示す。

Sotatercept はヒトのアクチビン A、アクチビン B、GDF11及び BMP10と高親和性で結合した。Sotatercept は内因性受容体へのリガンド結合の阻害により、ヒトのアクチビン A、アクチビン B、GDF11及び GDF8による Smad2/3のシグナル伝達を阻害した。また、sotatercept は BMP10に高親和性で結合するが、BMP10による Smad1/5/8のシグナル伝達に対する IC_{50}値はヒトのアクチビン A、アクチビン B 及び GDF11と比較して高値を示した。

一方で、sotatercept はヒト BMP6及び BMP9に低親和性を示し、BMP6及び BMP9により誘導される Smad1/5/8のシグナル伝達を阻害しなかった。Sotatercept はヒト TGF-β1、TGF-β2及び TGF-β3とは結合せず（[4.2.1.1.3: PD001]の Table 5）、これらのリガンドによる細胞内シグナル伝達も阻害しなかった。

入手可能なマウス由来の主要なリガンドと sotatercept の結合について、表面プラズモン共鳴法での結合試験を実施した結果、sotatercept はマウス及びヒトのリガンドと類似した結合親和性を示した（[4.2.1.1.3: PD001]の Table 7、[表 2.6.2-1]）。

表 2.6.2-1　表面プラズモン共鳴法での sotatercept とヒト TGF-β リガンドの結合親和性

リガンド	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M) [a]
アクチビン A	1.12×10^7	4.82×10^{-4}	4.30×10^{-11}
アクチビン B	1.73×10^7	1.87×10^{-4}	1.08×10^{-11}
アクチビン C[b]	Transient binding		4.89×10^{-8}
GDF3	2.68×10^6	3.20×10^{-3}	1.19×10^{-9}
GDF5[b]	Transient binding		2.96×10^{-8}
GDF7[b]	Transient binding		2.30×10^{-8}
GDF8	3.06×10^6	1.19×10^{-3}	3.90×10^{-10}
GDF11	1.26×10^7	8.57×10^{-4}	6.78×10^{-11}
BMP2[b]	Transient binding		1.99×10^{-7}
BMP4[b]	Transient binding		3.11×10^{-8}
BMP5	9.15×10^6	8.17×10^{-3}	8.93×10^{-10}
BMP6	2.46×10^7	2.76×10^{-2}	1.12×10^{-9}
BMP7	4.98×10^7	2.32×10^{-2}	4.66×10^{-10}
BMP9[b]	Transient binding		7.48×10^{-9}
BMP10	5.34×10^7	4.13×10^{-3}	7.74×10^{-11}
BMP15[b]	Transient binding		2.30×10^{-7}
Inhibin A[b]	Transient binding		1.52×10^{-8}

BMP：骨形成蛋白質、GDF：成長分化因子、k_a：結合速度定数、k_d：解離速度定数、K_D：平衡解離定数（結合親和性）、M：molar、s：seconds、TGF-β：形質転換成長因子 β
ヤギ抗ヒト Fc 抗体をセンサーチップに固相化し、sotatercept を結合させた。37℃で2段階希釈した TGF-β のリガンドを含む媒体を流し、sotatercept に対するリガンドの結合を300秒間測定した。その後リガンドを含まない媒体を流し、リガンドの解離を600秒間測定した。反射光に基づくセンサーチップ表面での質量変化のデータから得られた k_a 及び k_d より、K_D 値を算出した。
[a] K_D：反応速度論解析で得られた k_d/k_a の比
[b] 複合体の結合及び解離が非常に速く（transient binding）、正確な k_a 及び k_d 値を測定できなかったため、平衡状態での K_D 値を steady-state affinity model を用いて算出した。
[4.2.1.1.3: PD001]の Table 6を変更して示した。

表 2.6.2-2　レポーター遺伝子を導入した細胞培養系でのヒトリガンドによるシグナル伝達に対する sotatercept の阻害－1

リガンド	Sotatercept の IC_{50}値	
	ng/mL	pM
GDF8	630.7	8,080
GDF11	27.4	351.1
アクチビン A	11.2	143.5
アクチビン B	4.4	56.4
BMP6	>20,000	>256,250
BMP9	>10,000	>128,120
BMP10	2,235	28,640

BMP：骨形成蛋白質、GDF：成長分化因子、IC_{50}：50%阻害濃度、M：molar、n：number
Smad2/3の結合配列を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子（$pGL3(CAGA)_{12}$）及び内部対照のルシフェラーゼレポーター遺伝子（pRL-CMV）を A204細胞に導入した（GDF8、GDF11、アクチビン A、アクチビン B）。また、Smad1/5/8の結合配列を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子（pGL3 BRE）及び pRL-CMV を HepG2 細胞（BMP6）又は T98G 細胞（BMP9、BMP10）に導入した。細胞にリガンド及び3段階希釈した sotatercept を添加し、37℃で6時間（GDF8、GDF11、アクチビン A、アクチビン B）又は18～20時間（BMP6、BMP9、BMP10）培養した。細胞溶解液中の試験対象ルシフェラーゼ活性を測定し、内部対照のルシフェラーゼ活性で補正した（n=2）。IC_{50}値を GraphPad Prism を用いて算出した。
[4.2.1.1.4: PD002]の Table 2を変更して示した。

2.6.2.2.2 In vivo での効力を裏付ける試験

2.6.2.2.2.1 マウスの相同分子 RAP-011

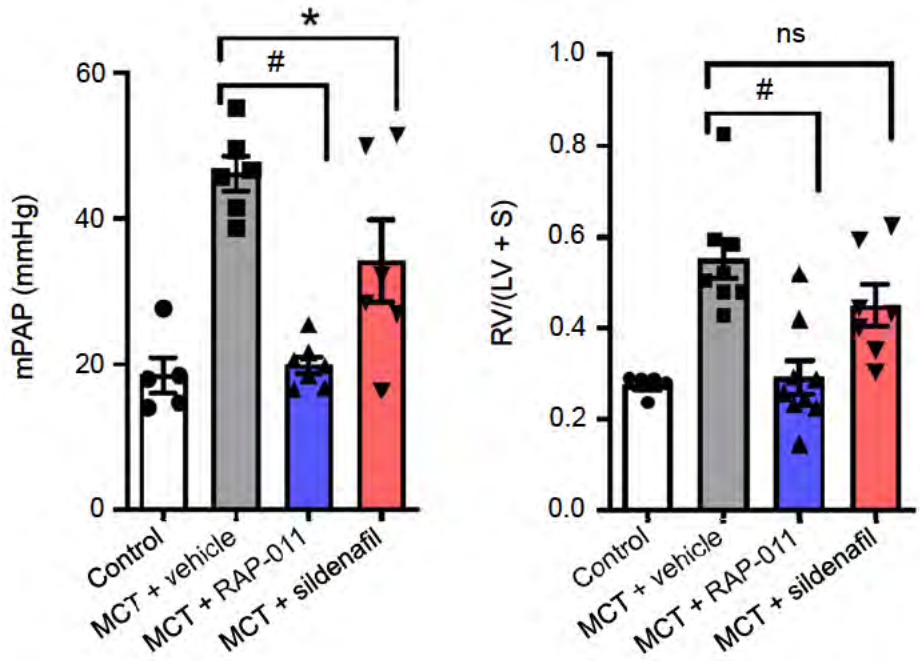
Sotatercept のマウスの相同分子である RAP-011を用いて、in vivo での非臨床薬理試験を実施した[4.2.1.1.3: PD001]。RAP-011は sotatercept のヒト免疫グロブリン G1（IgG1）Fc をマウス IgG2a Fc に置換した分子である。RAP-011は TGF-β ファミリーのリガンドに対して sotatercept と類似した結合親和性及び選択性を示した（[4.2.1.1.3: PD001]の Table 7、8及び[表 2.6.2-1]）。

2.6.2.2.2.2 モノクロタリン及び Sugen-hypoxia 誘発ラット肺動脈性肺高血圧症モデルでの RAP-011の効果

汎用されているモノクロタリン及び Sugen-hypoxia（SuHx）誘発ラット PAH モデルでの RAP-011の効果を検討した[4.2.1.1.5: PD007]。両モデルとも、内皮細胞及び平滑筋細胞の増殖、肺動脈系の筋性化、肺高血圧の発症、右室肥大等の PAH に関連する主要な病態が再現されている。

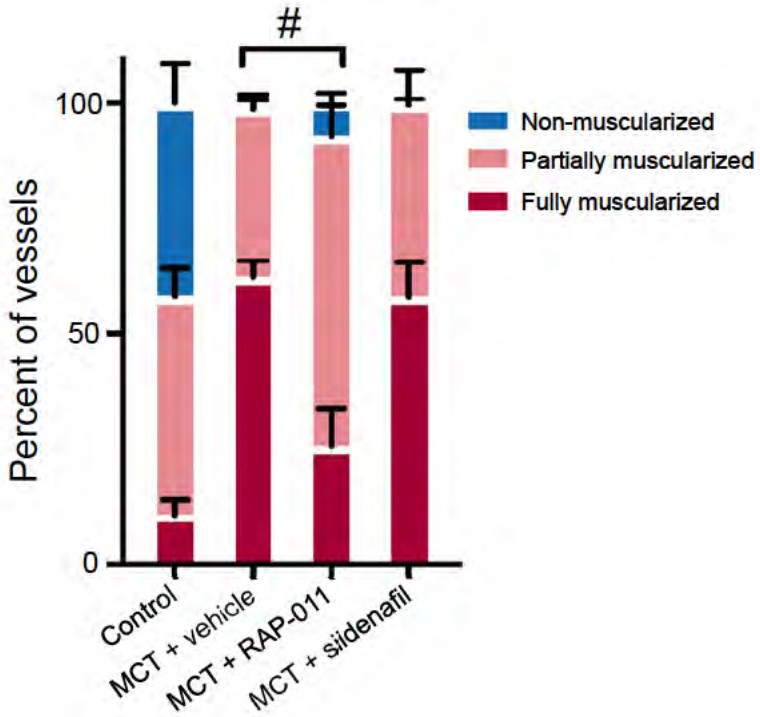
モノクロタリンモデルでは、成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに内皮傷害を誘導するモノクロタリンの40 mg/kg を単回皮下投与することにより、4週間以内に肺高血圧症が誘発される。媒体（10 mM トリス緩衝生理食塩液）、RAP-011（15 mg/kg/回、週2回、腹腔内）又は血管拡張薬であるシルデナフィル（30 mg/kg/回、1日2回、経口）をモノクロタリンの投与1日後から4週間投与した。媒体群では、平均肺動脈圧の顕著な増加及び右室肥大が認められた[図 2.6.2-2]。RAP-011を4週間投与した結果、平均肺動脈圧の増加及び右室肥大の進展が抑制された。シルデナフィル群では平均肺動脈圧の増加抑制がみられたが、右室肥大の進展は抑制されなかった。また、RAP-011の投与により肺血管のリモデリングに対する抑制効果が認められた[図 2.6.2-3]。

図 2.6.2-2 モノクロタリン誘発ラット PAH モデルでの平均肺動脈圧及び右室肥大に及ぼす RAP-011 の影響



MCT：モノクロタリン、mmHg：millimeters of mercury、mPAP：平均肺動脈圧、n：number、ns：有意差なし、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差
成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに40 mg/kg のモノクロタリンを単回皮下投与し、常圧常酸素条件下で4週間飼育した。媒体（10 mM トリス緩衝生理食塩液）、RAP-011（15 mg/kg/回、週2回、腹腔内）又はシルデナフィル（30 mg/kg/回、1日2回、経口）をモノクロタリンの投与1日後から4週間投与した。麻酔下で圧トランスデューサーのカテーテルを右内頸静脈より右室に留置し、mPAP を測定した。摘出心臓の左室自由壁＋中隔（LV＋S）と右室自由壁（RV）を切離後、重量を測定した。右室肥大の程度を Fulton 係数である RV/(LV＋S)比より評価した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=5～9）。一元配置分散分析後 Sidak の事後検定（mPAP）及び Kruskal-Wallis 検定後 Dunn の事後検定（RV/(LV＋S)）により解析した。$^{\#}$：$p<0.0001$、*：$p<0.05$
[4.2.1.1.1: 080ZZX]の Fig. 3のパネル B（左図）及びパネル C（右図）を変更して示した。

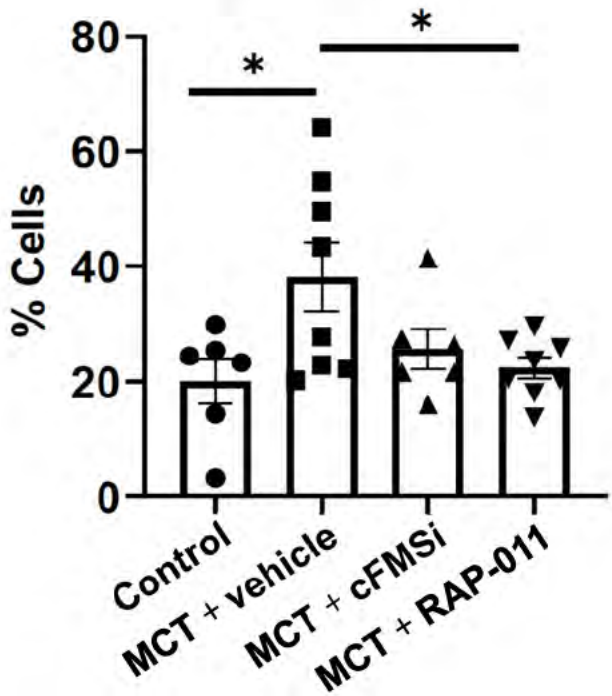
図 2.6.2-3　モノクロタリン誘発ラット PAH モデルでの肺血管のリモデリングに及ぼす RAP-011 の影響



α-SMA：α-平滑筋アクチン、MCT：モノクロタリン、n：number、PAH：肺動脈性肺高血圧症、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差
[図 2.6.2-2]に示した動物の肺を右室を介して PBS で環流後、右室経由で1%パラホルムアルデヒドを含む PBS で1分間環流し、その後気管経由で気道を1分間環流した。肺をパラフィンに包埋し、切片を α-SMA で免疫染色した。末梢血管（直径10～50 μm）の筋性化を非筋性化、部分筋性化及び完全筋性化に分類し、全血管に対する相対比率（%）を算出した。RAP-011又はシルデナフィルを投与したラットでの筋性化した血管の相対比率（%）を媒体群と比較した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=3～6で、各検体あたり30～50個の血管を計数した）。二元配置分散分析後 Tukey 及び Dunnett の多重比較検定により解析した。#：$p<0.0001$
[4.2.1.1.1: 080ZZX]の Fig. 3のパネル E を変更して示した。

モノクロタリンモデルでの同様の試験で、無処置群と比較して媒体群ではラットの肺での CD11b 陽性マクロファージの増加が認められたが、RAP-011群では CD11b 陽性マクロファージの増加が抑制された[図 2.6.2-4]。RAP-011は本 PAH モデルで肺炎症を抑制し、炎症マーカーであるマクロファージの浸潤を阻害した。

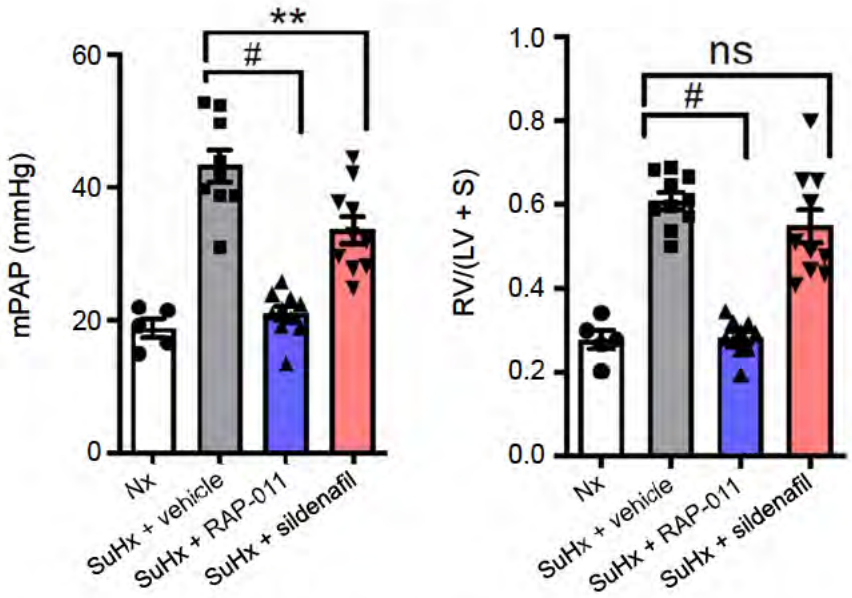
図 2.6.2-4　モノクロタリン誘発ラット PAH モデルの肺での CD11b 陽性マクロファージの浸潤に及ぼす RAP-011 の影響



cFMSi：コロニー刺激因子1阻害薬（GW2580）、MCT：モノクロタリン、n：number、PAH：肺動脈性肺高血圧症、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差
雄性 Wistar ラットに60 mg/kg のモノクロタリンを単回皮下投与し、常圧常酸素条件下で4週間飼育した。媒体（10 mM PBS、週2回、皮下）、cFMSi（80 mg/kg/回、0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース＋0.1% Tween20、1日2回、経口）又は RAP-011（5 mg/kg/回、週2回、皮下）をモノクロタリンの投与日から4週間投与した。肺を右室を介して PBS で環流後、肺葉を細切し、細胞懸濁液中の CD11b 陽性細胞数をフローサイトメトリーにより測定した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=6～8）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。*：$p<0.05$
[4.2.1.1.5: PD007]の Figure 3（下図）を変更して示した。

SuHx 誘発 PAH モデルでは、成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに血管内皮増殖因子受容体1/2拮抗薬である Sugen5416（200 mg/kg）を単回皮下投与後、常圧低酸素（酸素濃度10%）条件下で4週間飼育することにより肺高血圧症が誘発される。Sugen5416の投与1日後から、媒体（10 mM トリス緩衝生理食塩液）、RAP-011（10 mg/kg/回、週2回、腹腔内）又はシルデナフィル（60 mg/kg/回、1日2回、経口）を4週間投与した。媒体群では、平均肺動脈圧の顕著な増加及び右室肥大が認められた[図 2.6.2-5]。RAP-011群では4週間投与することにより、平均肺動脈圧の増加及び右室肥大の進展が抑制された。シルデナフィル群では、平均肺動脈圧の増加抑制がみられたが、右室肥大の進展は抑制されなかった。

図 2.6.2-5 SuHx 誘発ラット PAH モデルでの平均肺動脈圧及び右室肥大に及ぼす RAP-011 の影響

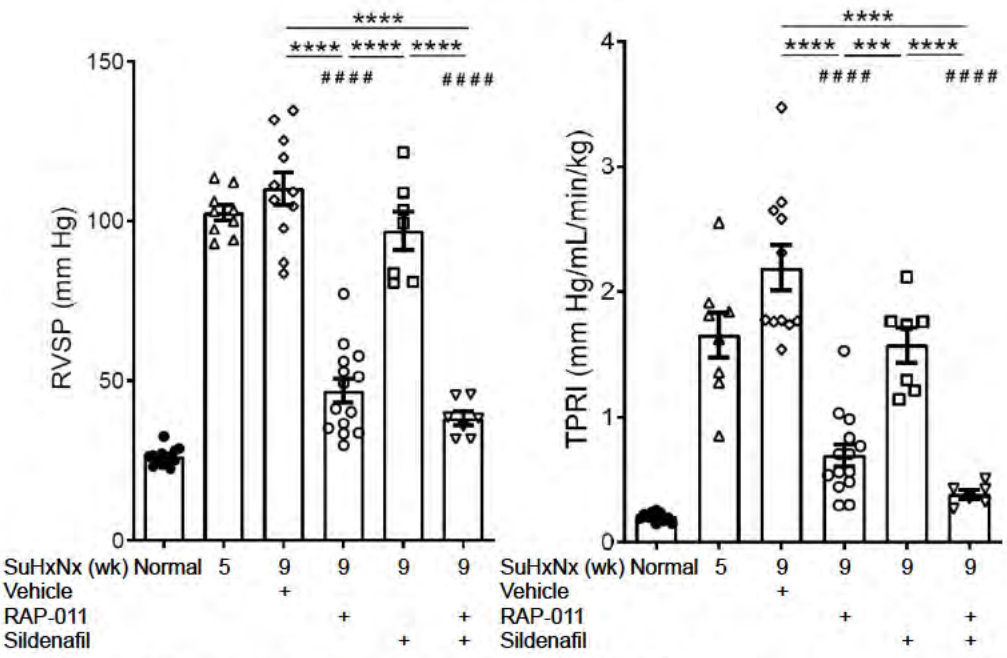


mmHg：millimeters of mercury、mPAP：平均肺動脈圧、n：number、ns：有意差なし、Nx：常圧常酸素、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差、SuHx：Sugen-hypoxia
成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに200 mg/kg の Sugen5416を単回皮下投与後、直ちに常圧低酸素（酸素濃度10%）条件下で4週間飼育した。媒体（10 mM トリス緩衝生理食塩液）、RAP-011（10 mg/kg/回、週2回、腹腔内）又はシルデナフィル（60 mg/kg/回、1日2回、経口）を Sugen5416の投与1日後から4週間投与した。[図 2.6.2-2]と同じ方法で mPAP を測定し、右室肥大を評価した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=5～10）。一元配置分散分析後 Dunnett の事後検定により解析した。#：$p<0.0001$、**：$p<0.01$
[4.2.1.1.1: 080ZZX]の Fig. 4のパネル B（左図）及びパネル C（右図）を変更して示した。

2.6.2.2.2.3 Sugen-hypoxia-normoxia 誘発ラット肺動脈性肺高血圧症モデルでのRAP-011の治療効果

RAP-011の治療効果を肺高血圧及び右室のリモデリングを呈した Sugen-hypoxia-normoxia（SuHxNx）ラットモデルを用いて検討した[4.2.1.1.7: PD005]。本モデルでは、成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに Sugen5416（20 mg/kg）を単回皮下投与後、常圧低酸素（酸素濃度10%）条件下で3週間、その後常圧常酸素（酸素濃度21%）条件下でさらに2又は6週間飼育した。SuHxNx ラットでは、治療開始時（Sugen5416投与第5週）には肺高血圧が認められ、第9週まで改善することなく持続した[図 2.6.2-6]。媒体（10 mM リン酸緩衝生理食塩液、週2回、皮下）、RAP-011（2.5 mg/kg/回、週2回、皮下）又はシルデナフィル（30 mg/kg/回、1日2回、皮下）を単独又は併用により第5～9週に治療投与した。媒体群では、右室収縮期圧及び全肺抵抗係数の増加が認められた。RAP-011の第5週からの投与により、第9週には右室収縮期圧及び全肺抵抗係数が媒体群と比較して顕著に改善した。RAP-011の単独及びシルデナフィルとの併用投与により、シルデナフィル単独群と比較して高い改善効果が認められた。

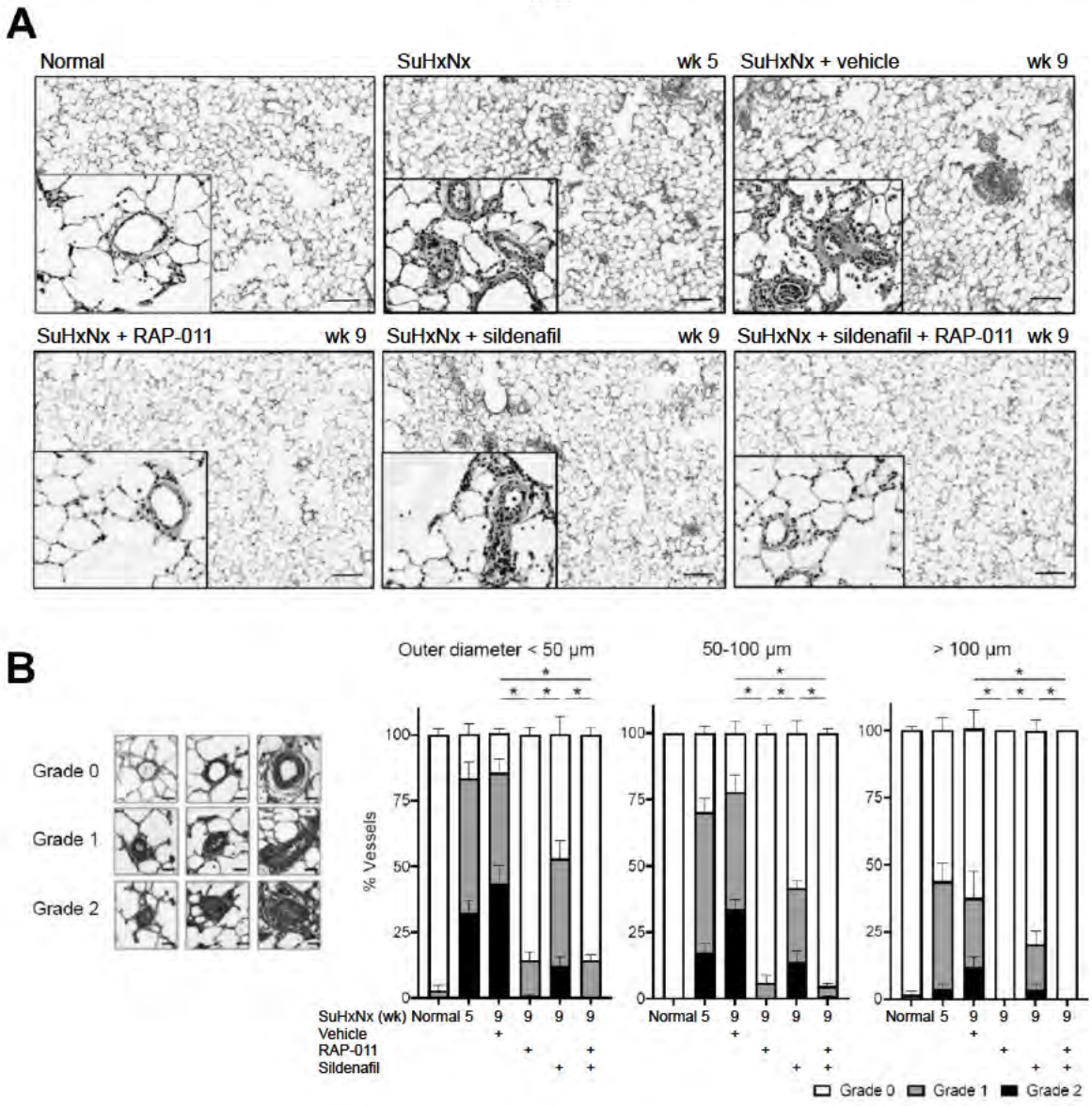
図 2.6.2-6 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの右室収縮期圧及び全肺抵抗係数に及ぼす RAP-011 の影響



mmHg：millimeters of mercury、n：number、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、RVSP：右室収縮期圧、SEM：平均値の標準誤差、SuHxNx：Sugen-hypoxia-normoxia、TPRI：全肺抵抗係数、wk：Week
成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに20 mg/kg の Sugen5416を単回皮下投与後、直ちに常圧低酸素（酸素濃度10%）条件下にて3週間、その後常圧常酸素（酸素濃度21%）条件下でさらに2又は6週間飼育した。媒体（10 mM リン酸緩衝生理食塩液、週2回）、RAP-011（2.5 mg/kg/回、週2回）又はシルデナフィル（30 mg/kg/回、1日2回）を単独又は併用により Sugen5416の投与5週から4週間皮下投与した。麻酔下で圧トランスデューサーのカテーテルを右頸静脈より右室に留置し、RVSP を測定した。麻酔下で圧－容積トランスデューサーのカテーテルを右頸動脈より左室に留置し、心拍出量を測定した。心拍出量を体重で除することにより心係数を算出し、RVSP を心係数で除することにより TPRI を推定した。
各値は平均値 ± SEM（n=7～14）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。***：p<0.001、****：p< 0.0001、####：第5週に比して p<0.0001
[4.2.1.1.6: PD004]の Figure 1（左図）及び Figure 2（右図）を変更して示した。

本モデルでは、第5週までに顕著な肺血管のリモデリングがみられ、種々の程度の血管閉塞を有する病変が認められた（[図 2.6.2-7]のパネル A 及び B）。第9週では、第5週と比較して、重度の血管閉塞の発現頻度が高くなり、この間の疾患の進行と一致していた。第5週からの RAP-011の投与により、正常群と比較して、第9週までに肺血管のリモデリングはほぼ完全に改善した。RAP-011の単独及びシルデナフィルとの併用投与により、シルデナフィル単独群と比較して血管閉塞に対する高い改善効果が認められた。

図 2.6.2-7　SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの肺血管のリモデリングに及ぼす RAP-011 の影響

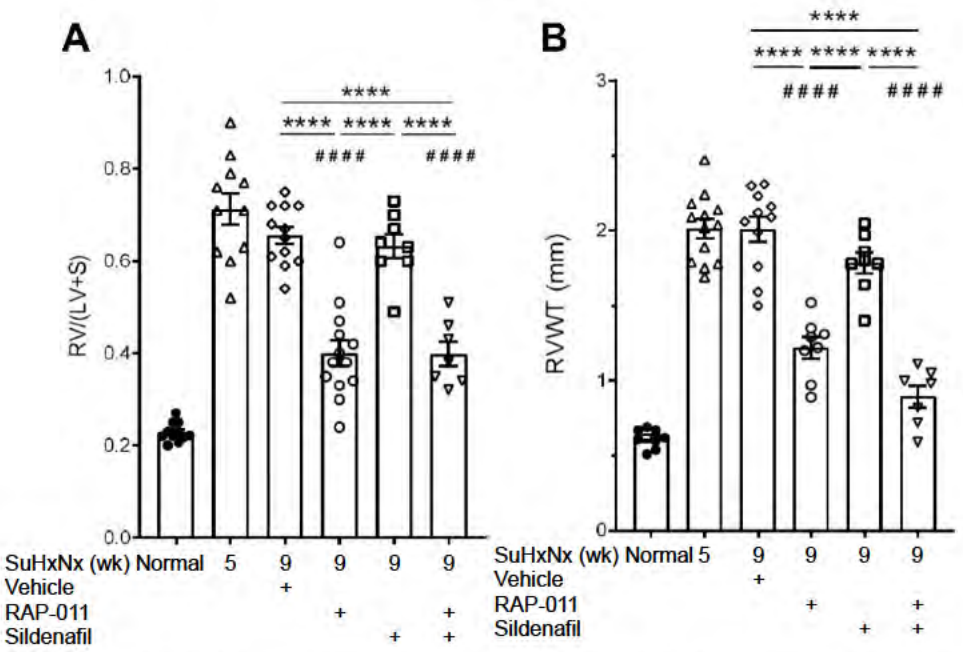


α-SMA：α-平滑筋アクチン、n：number、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差、SuHxNx：Sugen-hypoxia-normoxia、wk：Week
[図 2.6.2-6]に示した動物の肺を右室を介して生理食塩液で環流後、左肺を切除し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。左肺をパラフィンに包埋し、切片をヘマトキシリン・エオシン染色後、Verhoeff-Van Gieson 染色し、α-SMA を免疫染色した。肺動脈血管の壁厚を測定し、血管閉塞のグレードを判定した。
パネル A：ヘマトキシリン・エオシン染色した肺組織像。縮尺記号：200 µm
パネル B：（左図）α-SMA に対する抗体で免疫染色した肺切片の病理組織のグレード。縮尺記号：50 µm。（右図）血管外径により層別化した肺動脈血管の内腔閉塞の程度をグレード0（正常、内腔閉塞なし）、グレード1（内腔閉塞<50%）、グレード2（内腔閉塞≥50%）に分類した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=4）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。*：$p<0.05$
[4.2.1.1.6: PD004]の Figure 4を変更して示した。

また、本モデルでは右室のリモデリング及び機能の低下がみられる。無治療群では治療開始時（第5週）及び第9週に右室肥大の進展及び右室壁厚の増加が認められた[図 2.6.2-8]。第5週からのRAP-011の投与により、媒体群と比較して第9週までに右室肥大の進展及び右室壁厚の増加が改善

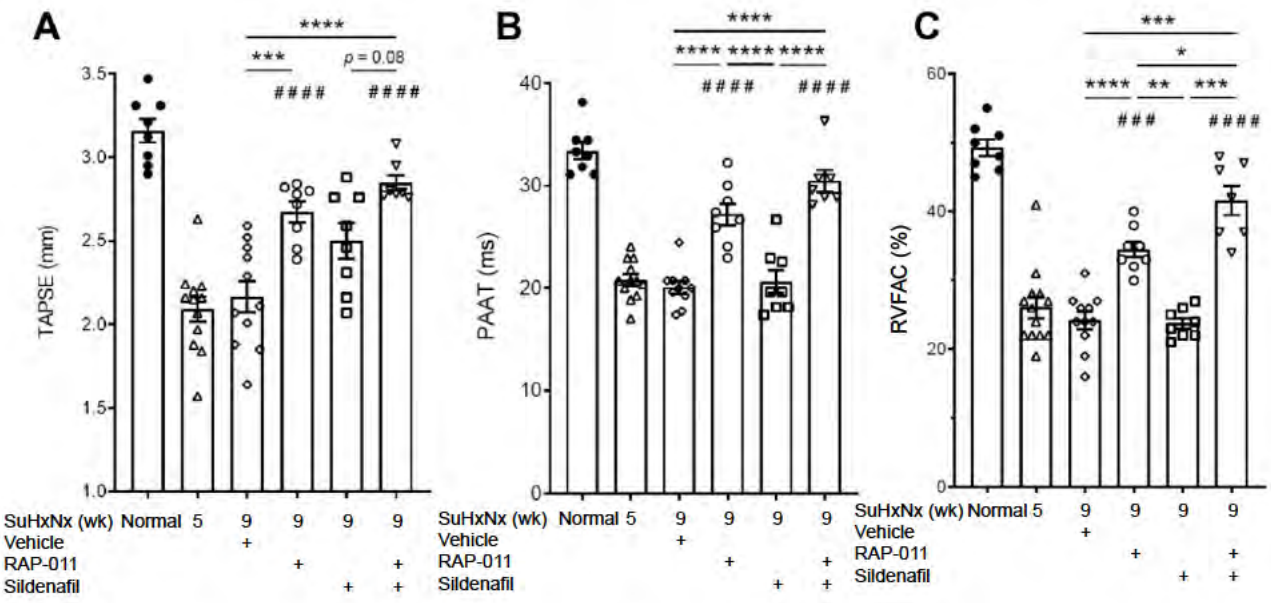
した。さらに、無治療群では治療開始時（第5週）及び第9週で三尖弁輪収縮期移動距離、肺動脈加速時間及び右室内腔面積変化率が減少し、右室機能の低下が認められた[図 2.6.2-9]。第5週からの RAP-011の投与により、第9週でこれらのパラメータは媒体群と比較して改善した。また、RAP-011を単独及びシルデナフィルと併用投与することにより、シルデナフィル単独群と比較して高い改善効果が認められた。

図 2.6.2-8　SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの右室肥大及び右室壁厚に及ぼす RAP-011 の影響



n：number、PAAT：肺動脈加速時間、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、RVFAC：右室内腔面積変化率、RVWT：右室壁厚、SEM：平均値の標準誤差、SuHxNx：Sugen-hypoxia-normoxia、TAPSE：三尖弁輪収縮期移動距離、wk：Week
[図 2.6.2-6]に示した動物で Sugen5416の投与第5週及び9週に麻酔下で背臥位にて心エコー検査を実施した。右室流出路を傍胸骨長軸像を用いて描出した。PAAT をパルス波ドプラ法により得られた肺動脈弁の末梢側の肺動脈内腔での血流の開始から最大速度までの時間として測定した。B モードの傍胸骨短軸像で心室中部断面を乳頭筋レベルにて描出した。RVWT を M モードの大動脈弁を通る傍胸骨長軸像を使用して測定した。RVFAC を B モードの心尖部四腔断面像を用いて測定した。TAPSE を M モードの三尖弁輪の外側を通る心尖部四腔断面像を使用して測定した。各パラメータを動物ごとに異なる3回の心拍より測定し、平均値を算出した。シルデナフィル単独群の心エコーパラメータ（RVWT）の値は、過去のデータを参照した。
また、摘出心臓の左室自由壁＋中隔（LV＋S）と右室自由壁（RV）を切離後、重量を測定した。右室肥大の程度を Fulton 係数である RV/(LV＋S)比より評価した。
各値は平均値 ±SEM を示す（n=7～14）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。****：$p<0.0001$、####：第5週に比して $p<0.0001$
[4.2.1.1.6: PD004]の Figure 6を変更して示した。

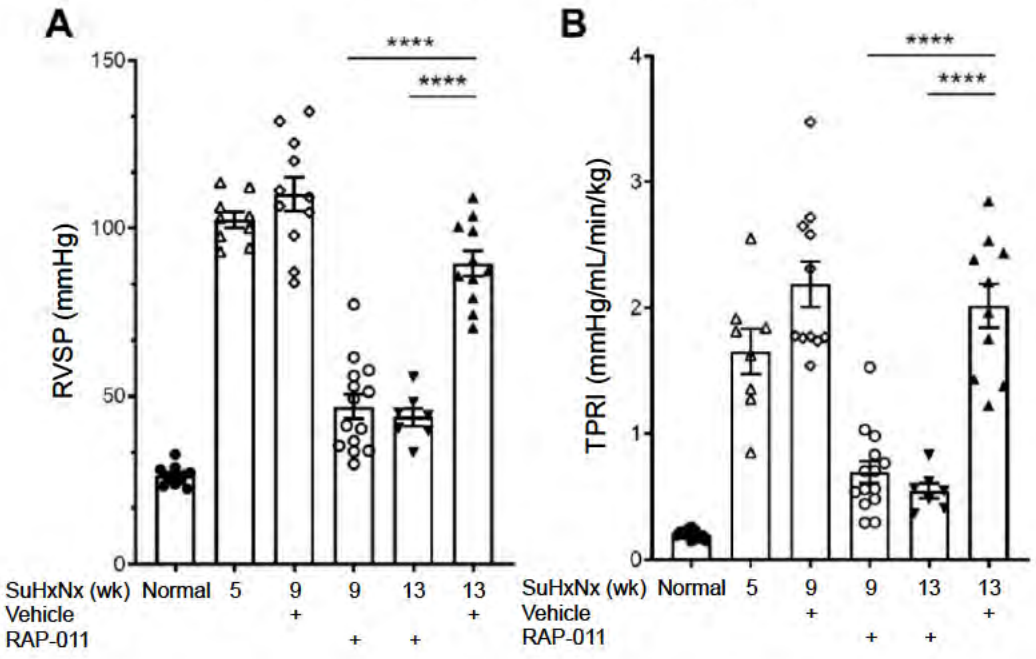
図 2.6.2-9 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの右室機能に及ぼす RAP-011 の影響



ms：milliseconds、n：number、PAAT：肺動脈加速時間、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、RVFAC：右室内腔面積変化率、SEM：平均値の標準誤差、SuHxNx：Sugen-hypoxia-normoxia、TAPSE：三尖弁輪収縮期移動距離、wk：Week
試験方法を[図 2.6.2-8]の脚注に示した。シルデナフィル単独群の心エコーパラメータ（TAPSE 及び PAAT）の各値は、過去のデータを参照した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=7～14）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。*：p<0.05、**：p<0.01、***：p<0.001、****：p<0.0001、###：第5週に比して p<0.001、####：第5週に比して p<0.0001
[4.2.1.1.6: PD004]の Figure 7の左図（パネル A）、Figure 3（パネル B）及び Figure 7の右図（パネル C）を変更して示した。

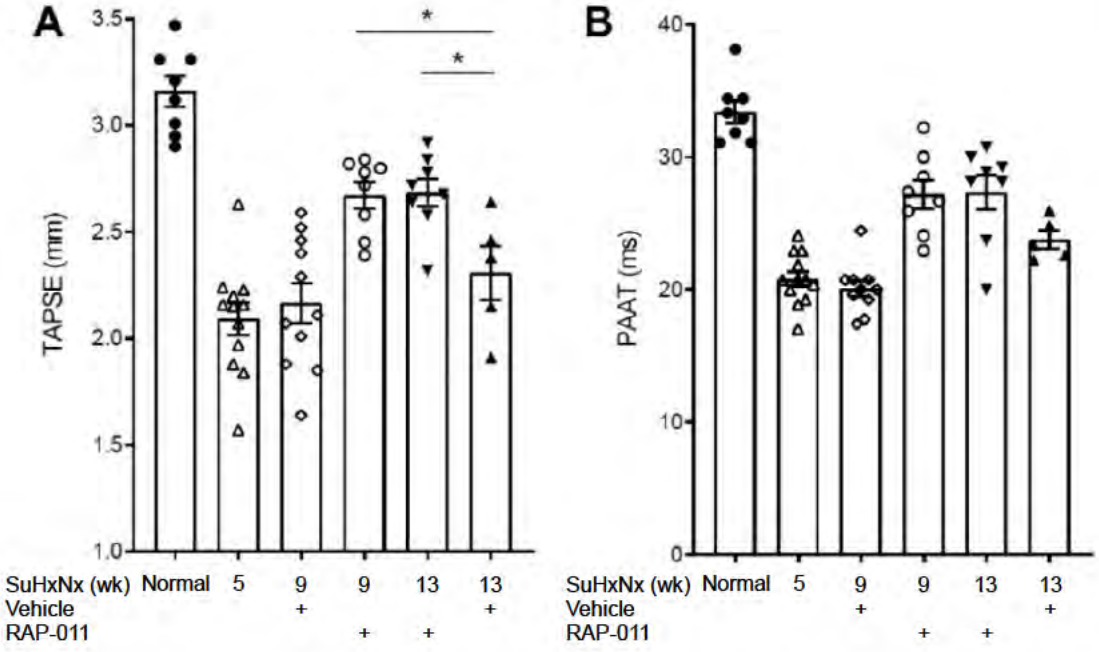
SuHxNx 誘発 PAH モデルでの心肺機能に及ぼす RAP-011の治療効果が、投与終了後も持続するかを評価するため、第9週に RAP-011の投与を終了し、さらに4週間動物の経過を観察した。その結果、第5週からの RAP-011の投与により、媒体を投与した SuHxNx ラットと比較して、第9週までに右室収縮期圧、全肺抵抗係数、三尖弁輪収縮期移動距離、肺動脈加速時間及び右室肥大の改善又は改善傾向が認められた[図 2.6.2-10]、[図 2.6.2-11]及び[図 2.6.2-12]。その後 RAP-011の投与終了から4週後の第13週まで、改善効果の持続又は持続傾向がみられた。

図 2.6.2-10 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの RAP-011 の治療投与終了後の右室収縮期圧及び全肺抵抗係数に及ぼす効果の持続性



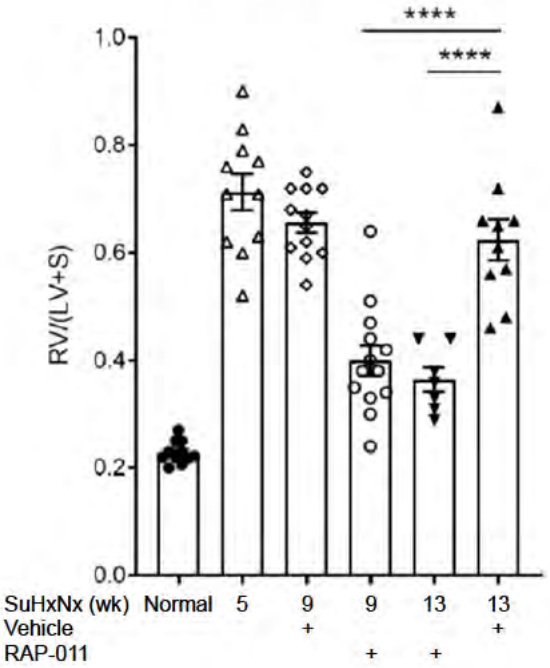
mmHg：millimeters of mercury、n：number、PAH：肺動脈性肺高血圧症、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、RVSP：右室収縮期圧、SEM：平均値の標準誤差、SuHxNx：Sugen-hypoxia-normoxia、TPRI：全肺抵抗係数、wk：Week
成熟雄性 Sprague-Dawley ラットに20 mg/kg の Sugen5416を単回皮下投与後、直ちに常圧低酸素（酸素濃度10%）条件下にて3週間、その後常圧常酸素（酸素濃度21%）条件下でさらに2、6又は10週間飼育した。媒体（10 mM PBS、週2回）及び RAP-011（2.5 mg/kg/回、週2回）を Sugen5416の投与第5週から4週間皮下投与し、Sugen5416の投与第9週から4週間、常圧常酸素条件下にてさらに飼育した。麻酔下で圧トランスデューサーのカテーテルを右頸静脈より右室に留置し、RVSP を測定した。麻酔下で圧－容積トランスデューサーのカテーテルを右頸動脈より左室に留置し、心拍出量を測定した。心拍出量を体重で除することにより心係数を算出し、RVSP を心係数で除することにより TPRI を推定した。
各値は平均値 ± SEM（n=7～13）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。****：$p<0.0001$
[4.2.1.1.7: PD005]の Figure 1（パネル A）及び Figure 2（パネル B）を変更して示した。

図 2.6.2-11 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの RAP-011 の治療投与終了後の右室機能に及ぼす効果の持続性



ms：milliseconds、n：number、PAAT：肺動脈加速時間、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差、SuHxNx：Sugen-hypoxia-normoxia、TAPSE：三尖弁輪収縮期移動距離、wk：Week
[図 2.6.2-10]に示した動物で第5、9及び13週に麻酔下で背臥位にて心エコー検査を実施した。右室流出路を傍胸骨長軸像を用いて描出した。TAPSE を M モードの三尖弁輪の外側を通る心尖部四腔断面像を使用して測定した。PAAT をパルス波ドプラ法により得られた肺動脈弁の末梢側の肺動脈内腔での血流の開始から最大速度までの時間として測定した。各パラメータを動物ごとに異なる3回の心拍より測定し、平均値を算出した。
各値は平均値 ± SEM（n=7～13）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。*：$p<0.05$
[4.2.1.1.7: PD005]の Figure 5（パネル A）及び Figure 3（パネル B）を変更して示した。

図 2.6.2-12 SuHxNx 誘発ラット PAH モデルでの RAP-011 の治療投与終了後の右室肥大に及ぼす効果の持続性

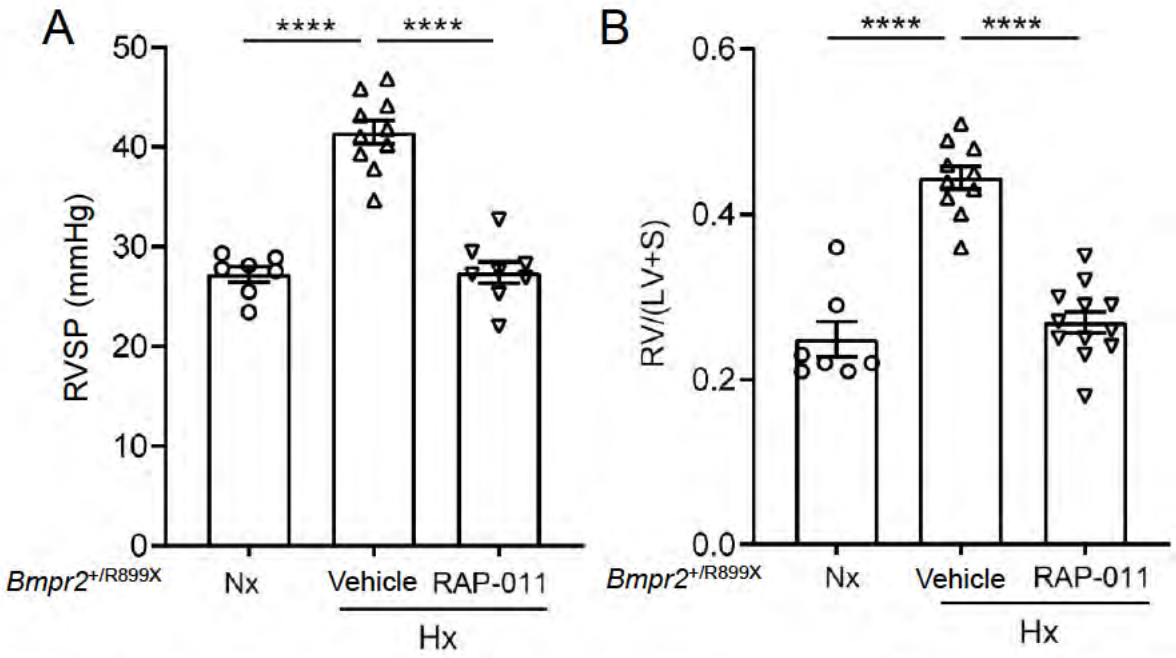


n：number、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差、SuHxNx：Sugen-hypoxia-normoxia、wk：Week
[図 2.6.2-10]に示した動物で摘出心臓の左室自由壁＋中隔（LV＋S）と右室自由壁（RV）を切離後、重量を測定した。右室肥大の程度を Fulton 係数である RV/(LV＋S)比より評価した。
各値は平均値 ±SEM を示す（n=7～13）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。****：$p<0.0001$
[4.2.1.1.7: PD005]の Figure 4を変更して示した。

2.6.2.2.2.4 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウス肺動脈性肺高血圧症モデルでの RAP-011の効果

*Bmpr2*のハプロ不全による遺伝性 PAH モデル（*Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウス）を用いて、RAP-011の効果を検討した[4.2.1.1.8: PD003]。本モデルでは、雄性 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウスを低酸素（酸素濃度10%）に5週間曝露することにより、肺高血圧症が誘導される。低酸素曝露開始から、媒体（10 mM リン酸緩衝生理食塩液、週2回、皮下）又は RAP-011（10 mg/kg/回、週2回、皮下）を5週間投与した。常酸素下での対照 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウスと比較して、低酸素曝露により媒体群では右室収縮期圧の増加及び右室肥大が認められた[図 2.6.2-13]。RAP-011の5週間の投与により、右室収縮期圧の増加及び右室肥大の進展が抑制された。常酸素下での対照 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウスと比較して、低酸素曝露により媒体群では三尖弁輪収縮期移動距離及び肺動脈加速時間が減少し、右室機能の低下が示された[図 2.6.2-14]。RAP-011の投与により、三尖弁輪収縮期移動距離及び肺動脈加速時間の減少が抑制された。

図 2.6.2-13 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウス PAH モデルでの右室収縮期圧及び右室肥大に及ぼす RAP-011 の影響



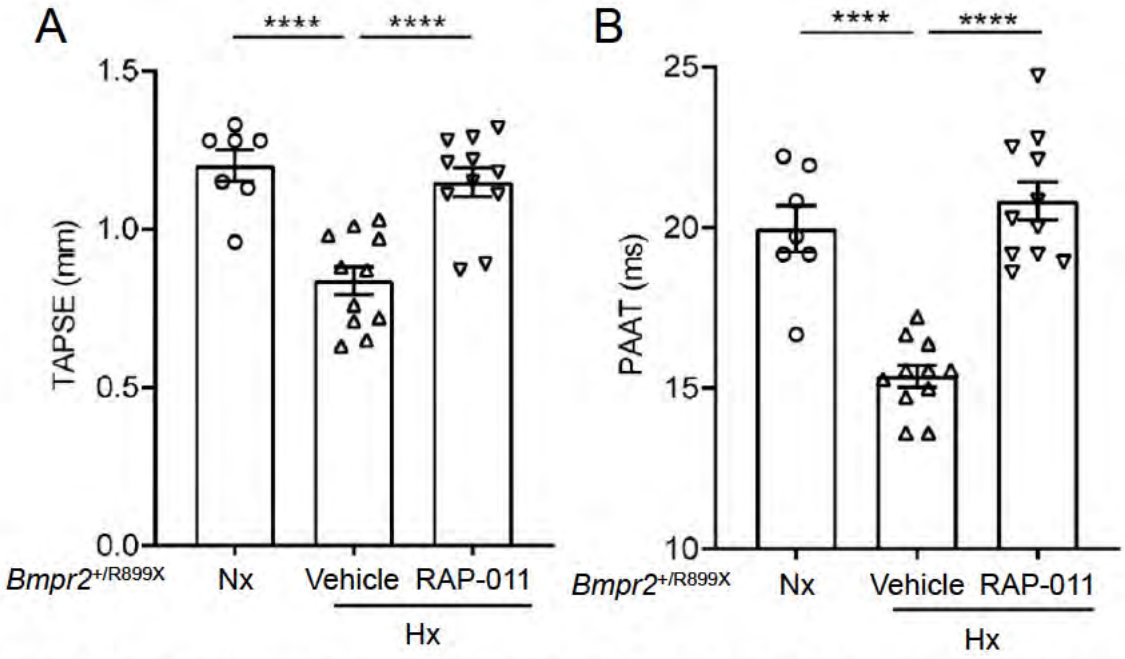
Hx：常圧低酸素、mmHg：millimeters of mercury、n：number、Nx：常圧常酸素、PAH：肺動脈性肺高血圧症、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、RVSP：右室収縮期圧、SEM：平均値の標準誤差

雄性 C57BL/6J（*Bmpr2*$^{+/R899X}$）マウスを常圧低酸素（酸素濃度10%）条件下にて5週間飼育した。常圧低酸素曝露開始から、媒体（10 mM PBS、週2回）又は RAP-011（10 mg/kg/回、週2回）を5週間皮下投与した。麻酔下で圧トランスデューサーのカテーテルを右頸静脈より右室に留置し、RVSP を測定した。摘出心臓の左室自由壁＋中隔（LV＋S）と右室自由壁（RV）を切離後、重量を測定した。右室肥大の程度を Fulton 係数である RV/(LV＋S) 比より評価した。

各値は平均値 ±SEM を示す（n=7～12）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。****：$p<0.0001$

[4.2.1.1.8: PD003]の Figure 2（パネル A）及び Figure 3（パネル B）を変更して示した。

図 2.6.2-14 *Bmpr2*$^{+/R899X}$ マウス PAH モデルでの右室機能に及ぼす RAP-011 の影響



Hx：常圧低酸素、ms：milliseconds、n：number、Nx：常圧常酸素、PAAT：肺動脈加速時間、PAH：肺動脈性肺高血圧症、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差、TAPSE：三尖弁輪収縮期移動距離
[図 2.6.2-13]に示した動物で第5週に麻酔下で背臥位にて心エコー検査を実施した。右室流出路を傍胸骨長軸像を用いて描出した。TAPSE を M モードの三尖弁輪の外側を通る心尖部四腔断面像を使用して測定した。PAAT をパルス波ドプラ法により得られた肺動脈弁の末梢側の肺動脈内腔での血流の開始から最大速度までの時間として測定した。各パラメータを動物ごとに異なる3回の心拍より測定し、平均値を算出した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=7～12）。一元配置分散分析後 Tukey の事後検定により解析した。****：$p<0.0001$
[4.2.1.1.8: PD003]の Figure 5（パネル A）及び Figure 4（パネル B）を変更して示した。

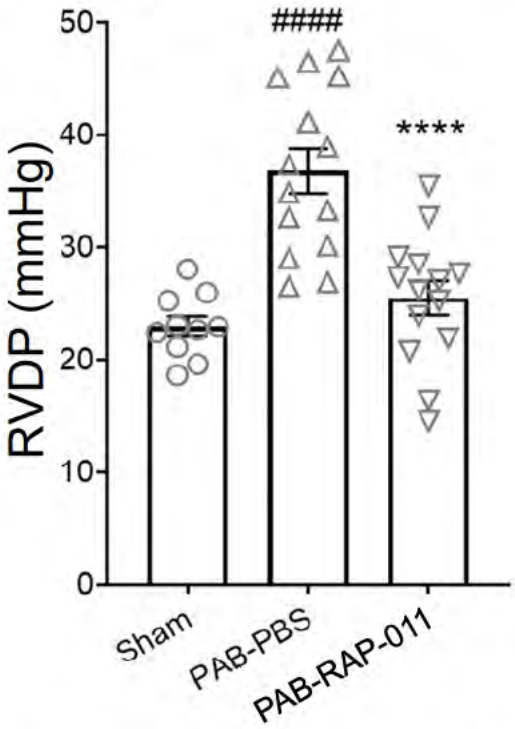
2.6.2.2.2.5 マウス肺動脈絞扼術誘発右心不全モデルでの RAP-011の効果

圧負荷による雄性 C57BL/6マウスでの右心不全モデルを用いて、RAP-011の心保護効果を検討した[4.2.1.1.9: PD006]。本モデルでは、肺動脈絞扼術（PAB）による右室の過負荷により右室のリモデリング及び機能低下が誘導される[4.3: 080RXB]。マウスに媒体（10 mM リン酸緩衝生理食塩液、週2回、皮下）又は RAP-011（10 mg/kg/回、週2回、皮下）を術後1日目から21日間投与した。手術の影響により、媒体を投与した PAB 群では偽手術群と比較して投与21日目の右室最大収縮期圧が増加した[図 2.6.2-15]。RAP-011の21日間の投与により、媒体を投与した PAB 群と比較して右室最大収縮期圧の増加が抑制された。また、媒体を投与した PAB 群では、偽手術群と比較して投与21日目の三尖弁輪収縮期移動距離が減少した[図 2.6.2-16]。RAP-011の投与により、媒体を投与した PAB 群と比較して三尖弁輪収縮期移動距離の減少が抑制された。

本モデルでは、右室のリモデリングも認められる。媒体を投与した PAB 群では、右室肥大が進展し、右室壁圧が増加した[図 2.6.2-17]。RAP-011の投与により、媒体を投与した PAB 群と比較して右室肥大の進展及び右室壁圧の増加が抑制された。また、媒体を投与した PAB 群では、偽手術群と比較して右室のコラーゲン量が増加した[図 2.6.2-18]。コラーゲン量の増加は、右室のリモデ

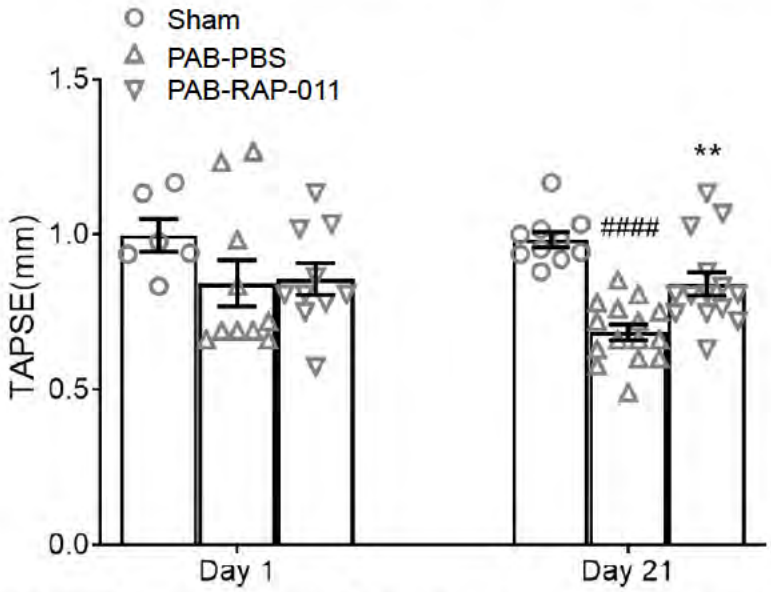
リング及び機能低下と関連している。RAP 011の投与により、媒体を投与した PAB 群と比較して右室のコラーゲン量の増加も抑制された。

図 2.6.2-15　マウス肺動脈絞扼術モデルでの右室最大収縮期圧に及ぼす RAP-011 の影響



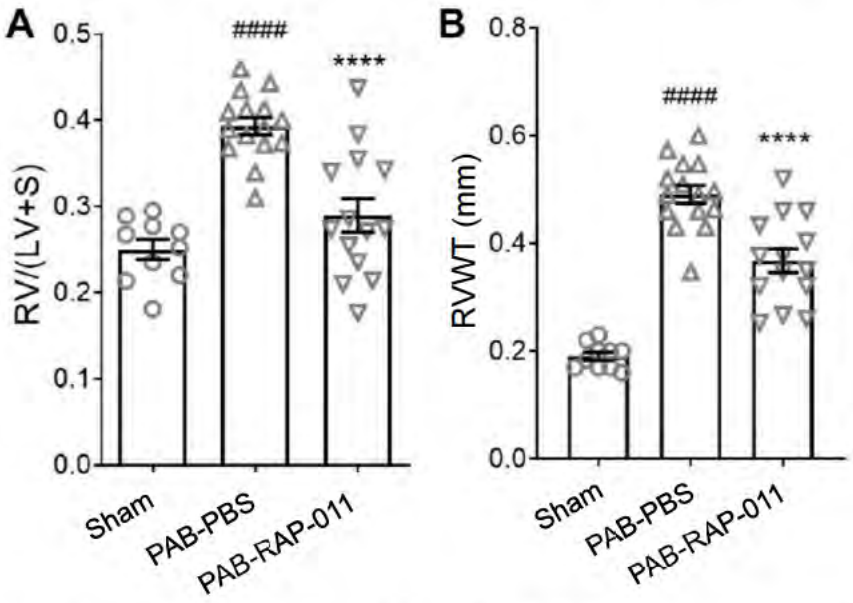
mmHg：millimeters of mercury、n：number、PAB：肺動脈絞扼術、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、RVDP：右室最大収縮期圧、SEM：平均値の標準誤差
雄性 C57BL/6マウスを麻酔下で第2肋間にて開胸し、肺動脈を露出させた。25ゲージの鈍針とともに肺動脈を結紮し、直ちに針を抜去後、閉胸した。術後1日目から、媒体（10 mM PBS）又は RAP-011（10 mg/kg/回）を週2回、21日間皮下投与した。投与21日目に動物を麻酔下で第3～4肋間にて開胸し、心臓を露出させた。圧トランスデューサーのカテーテルを右室に留置し、RVDP を測定した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=10～15）。一元配置分散分析後 Dunnett の事後検定により解析した。####：偽手術群に比して $p \leq 0.0001$、****：PBS を投与した PAB 群に比して $p \leq 0.0001$
[4.2.1.1.9: PD006]の Figure 3を変更して示した。

図 2.6.2-16　マウス肺動脈絞扼術モデルでの三尖弁輪収縮期移動距離に及ぼす RAP-011 の影響



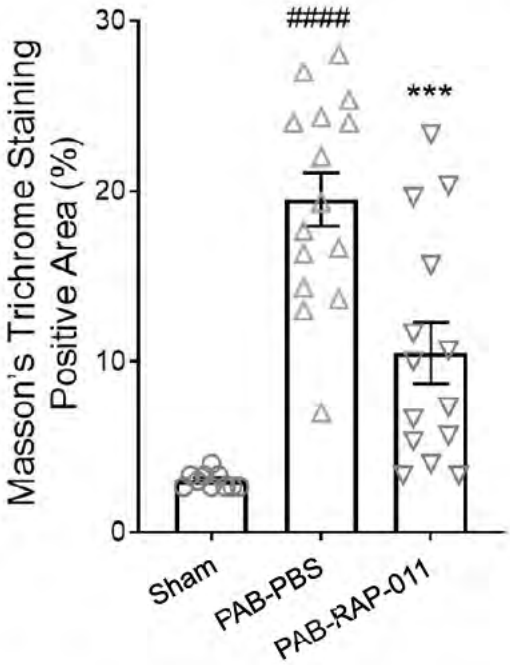
n：number、PAB：肺動脈絞扼術、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差、TAPSE：三尖弁輪収縮期移動距離
[図 2.6.2-15]に示した動物で投与前及び投与21日目に軽麻酔下で背臥位にて心エコー検査を実施した。TAPSE を M モードの三尖弁輪の外側を通る心尖部四腔断面像を使用して測定した。動物ごとに3～5回の心拍より測定し、平均値を算出した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=10～15）。一元配置分散分析後 Dunnett の事後検定により解析した。####：偽手術群に比して $p \leq 0.0001$、**：PBS を投与した PAB 群に比して $p \leq 0.01$
[4.2.1.1.9: PD006]の Figure 4を変更して示した。

図 2.6.2-17　マウス肺動脈絞扼術モデルでの右室肥大及び右室壁厚に及ぼす RAP-011 の影響



n：number、PAB：肺動脈絞扼術、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、RVWT：右室壁厚、SEM：平均値の標準誤差
[図 2.6.2-15]に示した動物で投与21日目に軽麻酔下で背臥位にて心エコー検査を実施した。RVWT を B 及び M モードの左傍胸骨長軸像を使用して測定した。摘出心臓の左室自由壁＋中隔（LV＋S）と右室自由壁（RV）を切離後、重量を測定した。右室肥大の程度を Fulton 係数である RV/(LV＋S)比より評価した。
各値は平均値 ±SEM（n=10～15）。一元配置分散分析後 Dunnett の事後検定により解析した。#### ：偽手術群に比して p≤0.0001、**** ：PBS を投与した PAB 群に比して p≤0.0001
[4.2.1.1.9: PD006]の Figure 1（パネル A）及び Figure 2（パネル B）を変更して示した。

図 2.6.2-18 マウス肺動脈絞扼術モデルの右室でのコラーゲン量に及ぼす RAP-011 の影響



n：number、PAB：肺動脈絞扼術、PBS：リン酸緩衝生理食塩液、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、SEM：平均値の標準誤差
[図 2.6.2-15]に示した動物で投与21日目に心臓を10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。心臓ごとに1個の中央切片をマッソン・トリクローム染色した。染色陽性の線維化面積及び全体の面積を測定し、右室でのコラーゲン量として線維化面積の割合（%）を算出した。心臓ごとに異なる3つの箇所での割合の平均値を算出した。
各値は平均値 ± SEM を示す（n=10～15）。一元配置分散分析後 Dunnett の事後検定により解析した。####：偽手術群に比して p≤0.0001、***：PBS を投与した PAB 群に比して p≤0.001
[4.2.1.1.9: PD006]の Figure 5を変更して示した。

2.6.2.3 副次的薬理試験

赤血球分化因子として報告されているアクチビンは、赤血球の分化の後期に作用することが知られていることから[4.3: 080SHT][4.3: 080RXN]、RAP-011を用いて作用機序から予想される赤血球造血に及ぼす影響を検討した。雄性 C57BL/6マウスに RAP-011を投与した結果、RAP-011の赤血球造血刺激因子としての作用により、赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリットが増加した[4.2.1.2.1: PD009][2.6.3.1 項]。また、エリスロポエチン蛋白質の増加が認められた。

生物活性及び特異性を評価する in vitro 試験、有効性を評価する in vivo 試験等、バイオテクノロジー応用医薬品の ICH S6に記載されている薬理試験の主要項目はいずれも効力を裏付ける試験として実施しているため、sotatercept の副次的薬理試験としてその他の試験を実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ICH S6（R1）ガイドラインに従い、サルを用いた GLP 適用9ヵ月間反復投与毒性試験に安全性薬理の評価項目（神経学的検査、並びに体温、呼吸数、心電図及び血圧測定）を組み込んだ

[2.6.6.3.3.4 項]。In vivo 安全性薬理の評価項目のいずれにも、sotatercept と関連する変化は認められなかった。

In vitro hERG 試験は、sotatercept を用いて実施した唯一の独立した安全性薬理試験であった。In vitro hERG 試験において、hERG カリウムチャネルに対する sotatercept の阻害作用の IC_{50}は 1,000 µg/mL を超えると推定された。試験は[redacted]（米国[redacted]）において GLP 下で実施した。米国は OECD の加盟国であるため、OECD データ相互受入れ制度が適用される。試験報告書には GLP 遵守の陳述書を含む。

2.6.2.4.1 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する sotatercept の影響（TT #[redacted]-7806）

[4.2.1.3.1: TT[redacted]7806]

Sotatercept は hERG 電流を阻害し、阻害率（平均値±標準誤差、n=3）は対照群2.4±0.8%に対して300 µg/mL 群、600 µg/mL 群及び1,000 µg/mL 群でそれぞれ7.2±0.7%、28.6±0.7%及び33.8±1.7%であった。全ての濃度において hERG 阻害は媒体対照値と比較して統計学的に有意であった（$p<0.05$）。hERG カリウム電流に対する sotatercept の阻害作用の IC_{50}は算出していないものの、1,000 µg/mL を上回ると推定された。検討した sotatercept の最高濃度（1,000 µg/mL）における安全域は、MRHD 投与時の臨床 C_{max} の約100倍である。

陽性対照のテルフェナジンでは、60 nM での hERG カリウム電流の阻害率（平均値±SD、n=2）は83.9±1.3%であった。この結果により、hERG 阻害に対する試験系の感受性が確認される。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

Sotatercept の薬力学的薬物相互作用を評価する非臨床試験を実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

Sotatercept はヒト ActRIIA の細胞外領域とヒト IgG1 Fc 領域を結合させた遺伝子組換え融合蛋白質である。Sotatercept は PAH 患者の治療用のアクチビンシグナル伝達阻害薬である。

Sotatercept は ActRIIA の可溶型として機能し、アクチビン A、アクチビン B、GDF11、GDF8、BMP10等の ActRIIA に結合する TGF-β ファミリーリガンドを捕捉し、ActRIIA への結合及び下流の Smad2/3シグナルの誘導を阻害する。この作用機序により、sotatercept は相反する Smad2/3及び Smad1/5/8の細胞内シグナル伝達経路のバランスを正常化し、その結果、PAH の平滑筋細胞の増殖の恒常性を回復させる。

In vitro での非臨床薬理試験の結果、sotatercept はヒト ActRIIA リガンドであるアクチビン A、アクチビン B、GDF11、GDF8、BMP10に結合した。Sotatercept はレポーター遺伝子を導入した細胞培養系でこれらのリガンドによる ActRIIA のシグナル伝達を阻害した。

Sotatercept のマウス相同分子である RAP-011は薬物誘発性 PAH モデル及び遺伝性 PAH モデル等の PAH の動物モデルで、肺血管のリモデリングの予防及び改善、肺高血圧症の予防及び改善、右室のリモデリング及び機能の改善を示した。また、RAP-011はモノクロタリン誘発 PAH モデルで、肺炎症を抑制し、炎症マーカーであるマクロファージの肺での浸潤を阻害した。

[表 2.6.2-3]に示すように、sotatercept はアクチビン A、アクチビン B、GDF8及び GDF11に高い親和性を示すヒト ActRIIA の細胞外領域とヒト IgG1の Fc 領域の遺伝子組換え融合蛋白質であり、PAH の病態形成に対して sotatercept の治療効果を得る上では、アクチビン A 及びアクチビン B と共に、GDF11及び GDF8を強力に阻害することが重要である[4.2.1.1.1: 080ZZX][5.4: 0826JW]。

表 2.6.2-3　レポーター遺伝子を導入した細胞培養系でのヒトリガンドによるシグナル伝達に対する sotatercept の阻害－2

リガンド	Sotatercept の IC_{50}値	
	ng/mL	pM
アクチビン A	11.2	143.5
アクチビン B	4.4	56.4
GDF8	630.7	8080
GDF11	27.4	351.1

GDF：成長分化因子、IC_{50}：50%阻害濃度
ELN: RGA T98G comparison of ACE_Molecules Comparison [redacted]_RC.report 20[redacted] ds ([redacted] Notebook [redacted])より
参照：[4.2.1.1.4: PD002]; [redacted] No. [redacted], [redacted] Notebook [redacted]

RAP-011は sotatercept のヒト IgG1 Fc をマウス IgG2a Fc に置換した分子である。ActRIIA の細胞外領域のアミノ酸配列及び構造は sotatercept と RAP-011で一致している。また、げっ歯類、カニクイザル及びヒト間の標的リガンドのアミノ酸配列の比較では、アクチビン A 及び GDF11については100%の一致率を示し、アクチビン B 及び BMP10については97%～98%の一致率を示しており[2.6.2.2.1.2 項]、RAP-011の標的リガンドに対する親和性は sotatercept と同様である。

Sotatercept 又は RAP-011の投与は、アクチビン及び GDF8/11を介した病的な Smad2/3の細胞内シグナル伝達経路を抑制するだけでなく、PAH の病態における Smad1/5/8シグナル伝達の不全を回復するとされている[4.2.1.1.1: 080ZZX][4.3: 4000]。その結果、sotatercept は増殖促進性（ActRIIA-Smad 2/3経路）と増殖抑制性（BMPR2-Smad 1/5/8経路）のシグナル伝達のバランスを回復させ、肺血管のリモデリングを抑制する。ラット PAH モデル及び in vitro 試験において、RAP-011は肺血管内皮細胞及び平滑筋細胞の増殖を抑制し、炎症誘発性及び増殖性の遺伝子発現を抑制し、PAH を有するげっ歯類の肺におけるマクロファージ浸潤を阻害した[4.2.1.1.1: 080ZZX][5.4: 0826JW]。また、RAP-011は左心不全による PAH モデルにおける心肺のリモデリング及び PAH を改善した[4.3: 4001]。最も重要な点として、sotatercept 及び RAP-011はいずれも、それぞれ PAH 患者及び PAH モデルにおいて、血行動態、右室肥大及び右室機能を改善した[4.2.1.1.1: 080ZZX][4.3: 4002]。

ラットを用いた複数の毒性試験におけるトキシコキネティクス（TK）解析において TK データ

が取得されている。例えば、sotatercept の反復投与時の TK は、GLP 適用下で実施したラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与 TK 試験（TT #[redacted]-7833）[表2.6.4-6]の一部として、0.3、3又は30 mg/kg の用量を週1回皮下投与した際に評価された。試験92日目における、上記3つの投与群の $AUC_{0\text{-}168h}$ に基づく平均血清中濃度はそれぞれ3.63、12.4及び151 µg/mL であった。

種々の用量で RAP-011を、週2回、皮下投与したラットモデルでいくつかの in vivo 薬理試験が実施された。これらの試験においてファーマコキネティクス（PK）データは取得していないが、1、2.5、3、10及び30 mg/kg の用量で週2回、sotatercept を皮下投与した薬理試験の薬物曝露量について上記毒性試験（TT #[redacted]-7833）の投与92日目の $AUC_{0\text{-}168h}$ から推定した値を[表 2.6.2-4]に示した。

表 2.6.2-4　TT #[redacted]-7833 の TK データに基づくラットを用いた PD004 試験における RAP-011 の推定血清中 PK パラメータ

Estimated RAP-011 Exposure Parameters in Pharmacology Studies

Parameter	Yung et al, 2020 1 mg/kg per dose[a]	PD004 2.5 mg/kg per dose[b]	Yung et al, 2020 3 mg/kg per dose[c]	Yung et al, 2020 10 mg/kg per dose[d]	PD004 30 mg/kg per dose[e]
$AUC_{0\text{-}84h}$ (µg·hr/mL)	697	1742	2090	8433	25,300
C_{avg} (µg/mL)	8.30	20.7	24.9	100	301

$AUC_{0\text{-}Xh}$：0から X 時間までの濃度－時間曲線下面積、C_{avg}：平均血清中濃度、PK：薬物動態、Q1W：週1回、RAP-011：sotatercept のマウス相同分子、TK：トキシコキネティクス

a 試験 5～9 週目にかけて、RAP-011 を 1 mg/kg の用量で週 2 回、皮下投与した。PK パラメータは、TT #[redacted]-7833 の 3 mg/kg 投与群（Q1W、皮下投与）の試験 92 日目の $AUC_{0\text{-}168h}$ 値から線形外挿した。

b 試験5～9週目にかけて、RAP-011を2.5 mg/kg の用量で週2回、皮下投与した。PK パラメータは、TT #[redacted]-7833の3 mg/kg/投与群（Q1W、皮下投与）の試験92日目の $AUC_{0\text{-}168h}$ 値から線形外挿した。

c 試験5～9週目にかけて、RAP-011を3 mg/kg の用量で週2回投与した。推定された PK パラメータは、TT #[redacted]-7833の3 mg/kg 投与群（Q1W、皮下投与）の試験92日目の $AUC_{0\text{-}168h}$ 値に基づいた。

d 試験5～9週目にかけて、RAP-011を10 mg/kg の用量で週2回投与した。PK パラメータは、TT #[redacted]-7833の30 mg/kg 投与群（Q1W、皮下投与）の試験92日目の $AUC_{0\text{-}168h}$ 値からの線形外挿に基づいた。

e 試験5～9週目にかけて、RAP-011を30 mg/kg の用量で週2回投与した。PK パラメータは、TT #[redacted]-7833の30 mg/kg 投与群（Q1W、皮下投与）の試験92日目の $AUC_{0\text{-}168h}$ 値からの推定値とした。

参照：[4.2.1.1.1: 080ZZX][4.2.1.1.6: PD004][4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]

RAP-011のリガンドに対する結合親和性及び in vivo 薬理試験における平均血清中濃度[表 2.6.2-4]に基づくと、薬理試験ではアクチビン A シグナル伝達経路に対する強力な阻害が1 mg/kg 以上で想定され、その際の平均血清中濃度は8.30 µg/mL と推定された。PAH モデルにおける有効性は、RAP-011を1、3及び10 mg/kg の用量で投与したモノクロタリン誘発ラット PAH モデル及び Sugen-hypoxia 誘発 PAH モデル[4.2.1.1.1: 080ZZX]に加え、異なる用量で実施された他の Sugen-hypoxia 誘発 PAH モデルでも一貫して示された[2.6.2.2.2.3 項]。RAP-011を1 mg/kg 以上の用量で投与した場合、これらのモデルでは、アクチビン A、アクチビン B、GDF8及び GDF11を強力に阻害し、充分に最大薬効がみられたと考えられた[4.2.1.1.1: 080ZZX]。PAH 患者に0.3 mg/kg 又は0.7 mg/kg で3週間ごとに sotatercept を皮下投与した際の定常状態における平均血清中濃度は、そ

れぞれ約3680 ng/mL 及び8260 ng/mL と推定されている[4.3: 4003]。

さらに重要な点として、sotatercept の標的に対する作用は、貧血患者を対象とした過去の第I相試験及び第Ⅱ相試験において臨床的に確認されている[4.3: 4004][4.3: 4005]。閉経後の健康女性に sotatercept を0.1、0.3又は1 mg/kg で28日ごとに皮下投与したところ、ヘモグロビン、ヘマトクリット及び赤血球数が用量依存的に増加した。Sotatercept の臨床における平均血清中濃度は、0.1、0.3及び1 mg/kg 群でそれぞれ0.553、1.948及び5.284 µg/mL であり、レポーター遺伝子アッセイの IC_{50} 値と比較すると、0.3 mg/kg 以上の群ではアクチビン、GDF8及び GDF11を含む主要なリガンドに対して顕著な阻害作用を示すと考えられる。興味深い点として、閉経後の健康女性において1 mg/kg 群では0.3 mg/kg 群と比較して有害事象が顕著に増加しており、sotatercept の1 mg/kg 投与後に8例中1例で症候性高血圧（143/113から180/120 mmHg）が認められた。この有害事象は、ヘモグロビンの急速かつ顕著な増加（ベースライン時13.5 g/dL に対し20.0 g/dL）によるものと考えられた[4.3: 4004]。これらの臨床データから、0.3 mg/kg 以上1 mg/kg 未満の用量で sotatercept を投与した際に、顕著な有害事象の増加を伴うことなく、治療目的に十分な標的への作用が得られると考えられる。

以上のように、sotatercept の用量反応性は RAP-011を用いたラット PAH モデル及び貧血患者を対象とした過去の後期第I相試験で明らかにされている。薬効の指標あるいは標的への作用に関連する sotatercept／RAP-011の濃度は、PAH 患者及び PAH モデル動物において、アクチビン及び GDF8/11を阻害すると予測される濃度と一致していた。

臨床及び非臨床試験における sotatercept 及び RAP-011の PK、標的への作用及び有効性データを総合すると、げっ歯類モデルを用いた RAP-011の in vivo 非臨床薬理試験の結果に基づいてヒトにおける sotatercept の有効性を推定できることが強く示唆された。

副次的薬理試験として、RAP-011を C57BL/6マウスに投与した結果、毒性試験及び臨床試験と同様に薬理作用に基づくと推察される血液系の所見（赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリットの増加）が認められた。

安全性薬理の評価はサルを用いて実施した sotatercept の慢性毒性試験において実施した。サルでは、心血管系、呼吸器系又は神経行動評価において影響はみられなかった。Sotatercept が高分子の選択的な治療用の蛋白質であることを考慮すると、QT 延長を誘発する hERG チャネルへ直接的に影響することは考えられない。この評価は、GLP 下で実施した hERG 試験の結果、hERG カリウムチャネルの阻害に関する IC_{50}が1,000 µg/mL（安全域は、MRHD 投与時の臨床 C_{max} の約100倍）を上回ると推定されたことと一貫しており、sotatercept が不整脈を誘発する可能性は低いことを示唆している。

Sotatercept の非臨床薬理試験として、他の薬物との薬力学的薬物相互作用試験を実施しなかった。

効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験により、WHO 分類第1群である PAH

の成人患者の sotatercept による治療を支持しているものと考えられる。

2.6.2.7 図表

図及び表を本文中の該当箇所に挿入した。

2.6.2.8 参考文献

参考文献は、[1.12 項]の「4.3参考文献」に示した。

目次

2.6.3　薬理試験概要表
2.6.3.1　薬理試験：一覧表
2.6.3.2　効力を裏付ける試験
2.6.3.3　副次的薬理試験
2.6.3.4　安全性薬理試験
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

C Confidential

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：Sotatercept

試験の種類	試験系	投与方法	試験実施施設	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験（in vitro）					
Sequence alignment: Sequence Alignment of Various TGF-β Superfamily Ligands	In vitro; data analysis	In vitro	[redacted]	PD008	[4.2.1.1.2: PD008]
Ligand affinity and specificity: Characterization of Sotatercept Ligand Specificity and Binding Kinetics by Surface Plasmon Resonance	In vitro; Biacore	In vitro	[redacted]	PD001	[4.2.1.1.3: PD001]
Ligand binding/receptor signaling: Sotatercept Inhibition of Ligand Signaling in a Cell-based Reporter Gene Assay	In vitro; cell-based assay	In vitro	[redacted]	PD002	[4.2.1.1.4: PD002]
Efficacy of RAP-011 in MCT rat model of PAH[a]: RAP-011 Effects on Macrophage Infiltration in the Lungs of Rats Treated With Monocrotaline	In vivo; Rat / Wistar	SC	[redacted]	PD007	[4.2.1.1.5: PD007]
効力を裏付ける試験（in vivo）					
Preclinical data of RAP-011 in experimental PAH models[a]: ACTRIIA-Fc rebalances activin/GDF versus BMP signaling in pulmonary hypertension	In vivo; Rat / Sprague Dawley	SC	[redacted]	080ZZX	[4.2.1.1.1: 080ZZX]
Efficacy of RAP-011 in Sugen-Hypoxia-Normoxia rat model of PAH[a]: Establish Sugen-Hypoxia-Normoxia Rat Model of PAH and Evaluate the Effect of RAP-011	In vivo; Rat / Sprague Dawley	SC	[redacted]	PD004	[4.2.1.1.6: PD004]
Efficacy of RAP-011 treatment withdrawal in Sugen-Hypoxia-Normoxia rat model of PAH[a]: Evaluate the Effect of RAP-011 Treatment Withdrawal in Sugen Hypoxia Normoxia Rat PAH Model	In vivo; Rat / Sprague Dawley	SC	[redacted]	PD005	[4.2.1.1.7: PD005]
Efficacy of RAP-011 in BMPR2$^{+/R899X}$ *mouse model of PAH*[a]: RAP-011 Effects on the Development of PAH in *Bmpr2*$^{+/R899X}$ Mice	In vivo; Mouse / C57BL/6J	SC	[redacted]	PD003	[4.2.1.1.8: PD003]
Efficacy of RAP-011 in PAB mouse model of right heart failure[a]: Cardiac Protection Effect of RAP-011 in the PAB Mouse Model of Right Heart Failure	In vivo; Mouse / C57BL6	SC	[redacted]	PD006	[4.2.1.1.9: PD006]

C Confidential

試験の種類	試験系	投与方法	試験実施施設	試験番号	記載箇所
副次的薬理試験					
Erythrocyte-stimulating-agent (ESA)-like activity of RAP-011[a]: Effects of RAP-011 in the Context of Erythropoietin Inhibition	In vivo; Mouse / C57BL/6	IP	[redacted]	PD009	[4.2.1.2.1: PD009]
安全性薬理試験					
hERG Assay[b]	In vitro; HEK293 cells	In vitro	[redacted]	TT #[redacted]-7806 ([redacted])	[4.2.1.3.1: TT[redacted]7806]
CNS & Cardiovascular Function[b]	In vivo; Monkey / Cynomolgus	SC	[redacted]	TT #[redacted]-7938 ([redacted])	[4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]
薬力学的薬物相互作用試験					
No studies have been performed to assess potential pharmacodynamics drug interactions.					

ActRIIA=activin receptor Type IIA; BMP=bone morphogenetic protein; BMPR2=bone morphogenetic protein receptor 2; CNS=Central Nervous System; GDF=growth and differentiation factor; hERG= human ether-à go-go related gene; HEK=human embryonic kidney; IP=intraperitoneal; MCT= monocrotaline; PAB=pulmonary artery banding; PAH=pulmonary arterial hypertension; SC=Subcutaneous; TGF-β=transforming growth factor -β; US/U.S.A.=United States of America.
Testing Facilities: [redacted], U.S.A.; [redacted], U.S.A.; [redacted], U.S.A.; [redacted], U.S.A.

a RAP-011, murine analogue of sotatercept, was tested.
b Report contains a GLP compliance statement. In TT #[redacted]-7806 ([redacted]), GLP compliant with the exception that the concentration, stability, and homogeneity of the positive control article (Terfenadine) formulations were not determined.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Sotatercept の効力を裏付ける試験の詳細を[2.6.2.2 項]に、その試験一覧を[2.6.3.1 項]に記載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

Sotatercept の副次的薬理試験の詳細を[2.6.2.3 項]に、その試験一覧を[2.6.3.1 項]に記載した。

2.6.3.4　安全性薬理試験

被験物質：Sotatercept

評価対象となる組織	動物種／系統	投与方法	投与量／濃度	性別及び動物数／群	特筆すべき所見	GLP適用	試験番号
hERG Assay	HEK293 cells	In vitro	0, 300, 600, 1000 µg/mL	3 cells	The IC_{50} for the inhibitory effect of sotatercept on hERG potassium current was not calculated but was estimated to be greater than 1000 µg/mL. The highest test concentration of sotatercept at 1000 µg/mL represents approximately a 100-fold margin as compared to the clinical C_{max} at 0.7 mg/kg.	Yes	TT #[redacted]-7806 ([redacted]) [4.2.1.3.1: TT[redacted]7806]
CNS, Cardiovascular, and Respiratory Function, and Body Temperature	Monkey / Cynomolgus	SC	0, 1, 2.6, 10 mg/kg	4-6M, 4-6F	There were no test article-related changes in neurological exam, ECG (six lead ECG), blood pressure (systolic, diastolic, mean arterial pressure), respiration, or body temperature parameters during the dosing and/or recovery phases of the study at systemic exposures up to $AUC_{0\text{-}504h}$ 51833 µg·hr/mL.	Yes	TT #[redacted]-7938 ([redacted]) [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]

$AUC_{0\text{-}504h}$=area under the concentration-time curve from 0 to 504 hours; C_{max}= observed maximum concentration; CNS=Central Nervous System; ECG=electrocardiogram; F=female; hERG=human ether-à go-go related gene; HEK=human embryonic kidney; IC_{50}=half-maximal inhibitory concentration; M=male; SC=subcutaneous.

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

Sotatercept の薬力学的薬物相互作用試験については、実施しなかった。