目次

表一覧
略号及び用語の定義
2.6.6 毒性試験の概要文
2.6.6.1 まとめ
2.6.6.2 単回投与毒性試験
2.6.6.2.1 Sprague-Dawley ラットを用いた sotatercept（10及び30 mg/kg）及び対照物質の単回静脈内投与試験（TT #[redacted]-7825）
2.6.6.3 反復投与毒性試験
2.6.6.3.1 ラット皮下投与
2.6.6.3.1.1 ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7823）
2.6.6.3.1.2 ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与トキシコキネティクス試験（TT #[redacted]-7833）
2.6.6.3.2 ラット静脈内投与
2.6.6.3.2.1 雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いた4週間の回復期間を伴う週1回4週間静脈内投与毒性試験（TT #[redacted]-7846）
2.6.6.3.3 サル皮下投与
2.6.6.3.3.1 カニクイザルを用いた2ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7824）
2.6.6.3.3.2 カニクイザルを用いた13週間の回復期間を伴う27週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7812）
2.6.6.3.3.3 カニクイザルを用いた2ヵ月間の回復期間を伴う9ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7826）
2.6.6.3.3.4 カニクイザルを用いた3ヵ月間の回復期間を伴う9ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7938）
2.6.6.3.4 サル静脈内投与
2.6.6.3.4.1 雌雄カニクイザルを用いた週1回の4回静脈内投与による毒性及びトキシコキネティクス試験（TT #[redacted]-7847）
2.6.6.4 遺伝毒性試験
2.6.6.5 がん原性試験
2.6.6.6 生殖発生毒性試験
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
2.6.6.6.1.1 Sprague Dawley ラットを用いた13週間の回復期間を伴う週1回皮下投与による GLP 適用の雄受胎能に関する試験（TT #[redacted]-7840）
2.6.6.6.1.2 雌ラットを用いた皮下投与による受胎能及び初期胚発生に関する試験（TT #[redacted]-7863）
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 ラットを用いた皮下投与による発生毒性試験（サテライト群でのトキシコキネティクス評価を含む）（TT #[redacted]-7913）
2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた皮下投与による用量設定発生毒性試験（サテライト群でのトキシコキネティクス評価を含む）（TT #[redacted]-7912）
2.6.6.6.2.3 ウサギを用いた週1回皮下投与による GLP 適用の胚・胎児発生毒性試験（TT #[redacted]-7841）
2.6.6.6.3 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
2.6.6.6.3.1 ラットを用いた皮下投与による GLP 適用の発生及び出生前／出生後の生殖に関する試験（出生後の行動／機能評価を含む）（TT #[redacted]-7830）
2.6.6.6.4 出生児（幼若動物）を用いた試験
2.6.6.6.4.1 幼若ラットを用いた回復期間を伴う12週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7832）
2.6.6.6.4.2 幼若ラットを用いた回復期間を伴う13週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7864）
2.6.6.7 局所刺激性試験
2.6.6.8 その他の毒性試験
2.6.6.8.1 抗原性／免疫原性試験
2.6.6.8.2 免疫毒性試験
2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験
2.6.6.8.4 依存性試験
2.6.6.8.5 代謝物に関する試験
2.6.6.8.6 不純物に関する試験
2.6.6.8.7 その他の試験
2.6.6.8.7.1 光毒性試験
2.6.6.8.7.2 マウスを用いた RAP-011の1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間腹腔内投与毒性試験（TT #[redacted]-7811）
2.6.6.8.7.3 雌 Sprague-Dawley ラットの5/6腎摘除モデル又は片側尿管結紮モデルを用いた sotatercept、[redacted]、RAP-011及び[redacted]の腎毒性試験（TT #[redacted]-7865）
2.6.6.9 考察及び結論
2.6.6.10 参考文献

表一覧

表 2.6.6-1 Sotatercept の毒性試験プログラム
表 2.6.6-2 皮下投与後のラットの平均（±SD）血清中 sotatercept 濃度（試験7日目、90日目及び120日目）（TT #[redacted]-7823）
表 2.6.6-3 皮下投与後のラット血清中 sotatercept の平均（±SE）TK パラメータ：試験1日目及び92日目（TT #[redacted]-7833）
表 2.6.6-4 静脈内投与後のラットの平均（±SD）血漿中 sotatercept 濃度：試験2日目、29日目及び57日目（TT #[redacted]-7846）
表 2.6.6-5 皮下投与後のサル血漿中 sotatercept の平均 TK パラメータ：試験1日目（TT #[redacted]-7824）
表 2.6.6-6 皮下投与後のサル血漿中 sotatercept の平均 TK パラメータ：試験1日目及び27週目（TT #[redacted]-7812）
表 2.6.6-7 皮下投与後のサル血漿中 sotatercept の平均 TK パラメータ：試験1日目、17週目及び37／39週目（TT #[redacted]-7938）
表 2.6.6-8 静脈内投与後のサルの平均（±SD）血漿中 sotatercept 濃度：試験29日目及び57日目）（TT #[redacted]-7847）
表 2.6.6-9 皮下投与後の雌ラットの平均（±SD）血清中 sotatercept 濃度（1回目及び3回目投与）（TT #[redacted]-7863）
表 2.6.6-10 皮下投与後の妊娠ラットの平均血清中 sotatercept 濃度（妊娠6日目及び13日目）（TT #[redacted]-7913）
表 2.6.6-11 皮下投与後の妊娠ウサギ血清中 sotatercept の平均 TK パラメータ：妊娠7日目及び14日目（TT #[redacted]-7912）
表 2.6.6-12 皮下投与後の胎児ウサギの平均血清中 sotatercept 濃度：妊娠29日目（TT #[redacted]-7912）
表 2.6.6-13 皮下投与後の妊娠ウサギ血清中 sotatercept の平均（±SD）TK パラメータ：妊娠7日目及び14日目（TT #[redacted]-7841）
表 2.6.6-14 皮下投与後の幼若ラット血漿中 sotatercept の平均（±SE）TK パラメータ：生後7日目及び91日目（TT #[redacted]-7832）
表 2.6.6-15 皮下投与後の幼若ラット血漿中 sotatercept の平均（±SE）TK パラメータ：生後7日目及び91日目（TT #[redacted]-7864）
表 2.6.6-16 Sotatercept の定常状態における全身曝露量及び曝露量比の概要

略号及び用語の定義

略号	定義	
αSMA	alpha smooth muscle actin	α平滑筋アクチン
ACE-011	sotatercept, also known as MK-7962 and ActRIIA-IgG1Fc	sotatercept、別名 MK-7962及び ActRIIA-IgG1Fc
ActRIIA	activin receptor type IIA	アクチビン受容体 IIA 型
ADA	anti-drug antibody(ies)	抗薬物抗体
ALK	activin receptor-like kinase	アクチビン受容体様キナーゼ
ALP	alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve	濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}Xh}$	area under the concentration-time curve from time 0 to X hours	投与後0から X 時間までの濃度－時間曲線下面積
BMC	bone mineral content	骨塩量
BMD	bone mineral density	骨密度
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
BUN	blood urea nitrogen	血中尿素窒素
C3	complement	補体
C_{max}	observed maximum concentration	最高濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
ECD	extracellular domain	細胞外ドメイン
EFD	embryo-fetal development	胚・胎児発生
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
EPO	erythropoientin	エリスロポエチン
Fc	fragment crystallizable	結晶化可能フラグメント
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価法
FSH	follicle stimulating hormone	卵胞刺激ホルモン
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
HCT	hematocrit	ヘマトクリット
HDW	hemoglobin distribution width	ヘモグロビン分布幅
HGB	hemoglobin	ヘモグロビン
hr	hour(s)	時間
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
IgG1	immunoglobulin G, subclass 1	免疫グロブリン G サブクラス1

略号	定義	
IgG2a	immunoglobulin G, subclass 2a	免疫グロブリン G サブクラス2a
IgM	immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IHC	immunohistochemistry	免疫組織化学
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
LH	luteinizing hormone	黄体形成ホルモン
MCH	mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	mean corpuscular volume	平均赤血球容積
miRNA	micro ribonucleic acid	マイクロリボ核酸
MK-7962	sotatercept or ACE-011, also known as ActRIIA-IgG1Fc	sotatercept 又は ACE-011、別名 ActRIIA-IgG1Fc
MPV	mean platelet volume	平均血小板容積
MRHD	maximum recommended human dose	最大臨床推奨用量
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無影響量
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PAH	pulmonary arterial hypertension	肺動脈性肺高血圧症
PBS	phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
Q1W	once weekly	週1回
Q2W	once every two weeks	2週間間隔
Q4W	once every four weeks	4週間間隔
RAP-011	murine surrogate for sotatercept, constructed by exchanging the human IgG Fc of sotatercept with a murine IgG Fc	sotatercept のヒト IgG Fc をマウス IgG Fc に置換したマウス代替相同分子
RBC	red blood cell count	赤血球数
RDW	red cell distribution width	赤血球分布幅
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	
TDAR	T-cell dependent antibody response	T 細胞依存性抗体応答
TEM	transmission electron microscopy	透過型電子顕微鏡
TGF-β	transforming growth factor -β	形質転換成長因子 β
TIM-1	T cell Ig mucin, also known as KIM-1 (kidney injury molecule 1)	T cell Ig mucin、別名 KIM-1 (kidney injury molecule 1)
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TW	twice weekly	週2回
UUL	unilateral ureteral ligation	片側尿管結紮
WHO	World Health Organization	世界保健機関

略号	定義	
WOE	weight of evidence	ウエイトオブエビデンス

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

Sotatercept（別名 MK-7962、旧称 ACE-011）は、ヒト ActRIIA の ECD をヒト IgG1の Fc 領域に結合させた遺伝子組換え融合蛋白質である。Sotatercept はジスルフィド結合した2つの単量体で構成され、それぞれの単量体は合計344個のアミノ酸からなる。

Sotatercept はアクチビンシグナル伝達阻害薬であり、その作用機序は[2.6.2 項]に示すとおり、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、GDF-11、GDF-8、BMP-10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[4.2.1.1.1: 080ZZX]。

Sotatercept の予定 MRHD は21日間隔の0.7 mg/kg 皮下投与であり、これはヒトの $AUC_{0\text{-}504h}$ 4,110.24 μg·hr/mL 及び C_{max} 9.67 μg/mL に相当する（[2.7.2 項]参照）。

Sotatercept の非臨床毒性試験プログラムとして、ラットを用いた最長3ヵ月間及びカニクイザルを用いた最長9ヵ月間の GLP 適用反復投与毒性試験、受胎能及び初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギを用いた EFD 毒性試験（sotatercept の胎盤通過性に関する評価を含む）、ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験、並びにラットを用いた幼若動物毒性試験を実施した。また、マウス及びラットを用いた探索的毒性試験を実施した。ICH S6（R1）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」に従い、本バイオ医薬品を用いた遺伝毒性試験は実施していない。ADA の発現及びそれに伴う血漿／血清中曝露量の減少が認められたこと、また、sotatercept に起因する腎毒性が長期生存に悪影響を及ぼす懸念があることから、ラットを用いた長期投与試験は実施しなかった。Sotatercept のがん原性については、WOE に基づきリスク評価を実施した。Sotatercept を用いて実施した試験の概要を[表 2.6.6-1]及び[2.6.7.1 項]に示す。

In vivo 毒性試験はラット、ウサギ及びカニクイザルを用いて実施した。これらの動物種は、マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおいて ActRIIA 標的リガンド（アクチビン A、アクチビン B、GDF-8、GDF-11、BMP-10）の配列相同性が高度に保存（97%以上）されており［非臨床試験報告書 PD008（[redacted] 社報告書番号 [redacted]）］、薬理学的反応性（ラット、カニクイザル及びヒトにおいてアクチビン A 及び GDF-11の阻害により赤血球パラメータが増加）が示されたこと、また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、毒性評価に適切と判断した。

皮下投与の間隔（ラット及びウサギで Q1W、サルで Q2W 又は Q4W）は、各動物種での sotatercept の体循環中半減期に基づき決定した。ラット及びウサギを用いた発生毒性試験において、TK 評価により主要な曝露期間中に sotatercept 濃度が維持されていることが確認された。サルを用いた最長9ヵ月間投与試験では、sotatercept を反復投与したときのトラフ濃度に基づき曝露量が維持されること、そして経時的に増加することが示された。ラット及びカニクイザルは、探索的臨床試験のための現行の規制ガイドライン［ICH M3（R2）ガイドライン：医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス等］に基づき、医薬品の毒性評価のための動物モデルとして容認されている。

ラット及びサルを用いた最初の4週間投与毒性試験では、健康被験者に皮下投与したときの絶対バイオアベイラビリティの予想を可能とするデータを取得するため、静脈内投与経路を採用した。臨床試験及び承認時の予定投与経路は皮下投与であるため、重要な3ヵ月間及び慢性投与毒性試験、生殖発生毒性試験、並びに幼若動物毒性試験は皮下投与で実施した。Sotatercept のマウス相同分子である RAP-011（ヒト ActRIIA の ECD をマウス IgG2a Fc 領域に結合させた分子）の毒性は、マウスを用いた3ヵ月間反復投与毒性試験において腹腔内投与により評価した。

重要な試験はいずれも GLP の原則に準拠して実施した。また、試験は全て[redacted]（米国[redacted]）、[redacted]（米国[redacted]）、[redacted]（米国[redacted]）、[redacted]（米国[redacted]）、[redacted]（米国[redacted]）、[redacted]（米国[redacted]）、又は[redacted]（米国[redacted]）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。全ての GLP 適用試験の報告書は GLP 遵守の陳述書を含む。全ての重要な試験で設定した用量の妥当性は、sotatercept の TK 評価により支持された（[2.6.7.2 項]及び[2.6.7.3 項]）。非臨床試験で使用した被験物質のバッチを[2.6.7.4 項]に示す。

表 2.6.6-1　Sotatercept の毒性試験プログラム

Study Type/ Duration	Route	Species / Strain	Dose Levels (mg/kg)	NOAEL (mg/kg)	Study No. (GLP Status)
Single-dose toxicity					
Toxicity / single dose	IV	Rat / Sprague Dawley	0, 10, 30	NA	TT #[redacted]-7825 / (Non-GLP)
Repeat-dose toxicity					
Toxicity with TK / Q1W for 3 months (13 doses), followed by a 1-month treatment-free period	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 0.3, 3, 30	3	TT #[redacted]-7823 / (GLP)[a]
Toxicity with TK / Q1W for 3 months (14 doses), followed by a 1-month treatment-free period	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 0.3, 3, 30	3	TT #[redacted]-7833 / (GLP)[b]
Toxicity with TK / Q1W for 4 weeks (4 doses), followed by a 4-week treatment-free period	IV	Rat / Sprague Dawley	0, 1, 10, 30	<1	TT #[redacted]-7846 / (GLP)[c]

Study Type/ Duration	Route	Species / Strain	Dose Levels (mg/kg)	NOAEL (mg/kg)	Study No. (GLP Status)
Toxicity with TK / Q2W for 3 months (7 doses), followed by a 2-month treatment-free period	SC	Monkey / Cynomolgus	0, 10, 30, 50	30	TT #[redacted]-7824 / (GLP)[a]
Toxicity with TK / Q2W for 27 weeks (14 doses), followed by a 13-week treatment-free period	SC	Monkey / Cynomolgus	0, 10, 30, 50	<10	TT #[redacted]-7812 / (GLP)[d, e]
Toxicity / Q2W for 9 months (study terminated early after 4 doses), followed by a 2-month treatment-free period[f]	SC	Monkey / Cynomolgus	0, 10, 30, 50	NA	TT #[redacted]-7826 / (GLP)[d]
Toxicity with TK / Q4W or Q2W for 9 months (10 or 20 doses), followed by a 3-month treatment-free period	SC	Monkey / Cynomolgus	0, 1, 2.6, 10	1	TT #[redacted]-7938 / (GLP)[g]
Toxicity with TK / Q1W for 4 weeks (4 doses), followed by a 4-week treatment-free period	IV	Monkey / Cynomolgus	0, 1, 10, 30	≥30	TT #[redacted]-7847 / (GLP)[c]
Reproductive & developmental toxicity					
Male fertility / Q1W for 13 weeks (13 doses) followed by a 13-week treatment-free period	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 0.3, 3, 30	3	TT #[redacted]-7840 / (GLP)
Female fertility and early embryonic development with TK / Q1W for 2 weeks through GD 7 (5 doses)	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 5, 15, 50	Maternal: 15 Developmental: 5	TT #[redacted]-7863 / (GLP)[e]
Embryo fetal development with TK / Q1W on GD 6 and 13 (2 doses)	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 5, 15, 50	Maternal: 50 Developmental: 5	TT #[redacted]-7913 / (GLP)
Range finding embryo fetal development with TK / Q1W on GD 7 and 14 (2 doses)	SC	Rabbit/ New Zealand White	0, 5, 15, 50	NA	TT #[redacted]-7912 / (Non-GLP)
Embryo fetal development with TK / Q1W on GD 7 and 14 (2 doses)	SC	Rabbit/ New Zealand White	0, 0.5, 1.5, 5	Maternal: 5 Developmental: 0.5	TT #[redacted]-7841 / (GLP)
Perinatal/Postnatal development / Q1W on GD 6 and 13 or LD 1, 8, and 15 (5 doses)	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 1.5, 5, 10	Maternal: 10 Gestation: 5 Lactation: 1.5	TT #[redacted]-7830 / (GLP)
Juvenile toxicity with TK / Q1W for 12 weeks (13 doses), followed by a 13-week treatment-free period	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 0.3, 3, 30	<0.3	TT #[redacted]-7832 / (GLP)[h]
Juvenile toxicity with TK / Q1W for 13 weeks (13 doses), followed by a 18-week treatment-free period	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 1, 3, 10	<1	TT #[redacted]-7864 / (GLP)[i]
Other toxicity studies					
Toxicity / TW for 3 months (26 doses), followed by a 1-month treatment-free period	IP	Mouse / CD-1	0, 10, 30, 50[j]	NA	TT #[redacted]-7811 / (GLP)[d]
Rat Renal Toxicity in 5/6 nephrectomy or unilateral ureter ligation model / Q1W for 13 weeks (13 doses)	SC	Rat / Sprague Dawley	0, 1, 10	NA	TT #[redacted]-7865 / (Non-GLP)

ADA=anti-drug antibody(ies); GD=Gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; IHC=immunohistochemistry; IP=intraperitoneal(ly); IV=intravenous(ly); LD=Lactation day; NA=not applicable; No.=number; PND=postnatal day; Q1W=once weekly; Q2W=once every two weeks; Q4W=once every four weeks; SC=subcutaneous(ly); TK=toxicokinetic(s); TW=twice weekly.

a TT #[redacted]-7823, TT #[redacted]-7824: GLP with the exception that TK and immunogenicity (ADA) evaluations did not have audits of sample testing phase and are consequently not fully compliant with GLP.

b TT #[redacted]-7833: GLP with the exception that urinary biomarker analysis was performed non-GLP.

c TT #[redacted]-7846, TT #[redacted]-7847: GLP with the exception that dose formulation, stability, drug concentration, and ADA analyses were performed non-GLP.

d TT #[redacted]-7812, TT #[redacted]-7826, TT #[redacted]-7811: GLP with the exception that test article characterization and stability were not performed GLP.

e TT #[redacted]-7812, TT #[redacted]-7863: GLP with the exception that TK analysis was done using non-GLP software.

f TT #[redacted]-7826: Terminated early due to high incidence of malaria in monkeys on study.

g TT #[redacted]-7938: GLP with the exceptions that polymerase chain reaction analysis used for prestudy animal health screening and IHC staining to investigate immune complex deposition was not performed GLP.

h TT #[redacted]-7832: GLP with the exception that erythropoietin evaluations were performed non-GLP.

i TT #[redacted]-7864: GLP with the exception that erythropoietin evaluations and PND 63 immunophenotyping analysis were performed non-GLP.

j TT #[redacted]-7811: Animals dosed with RAP-011, the murine ortholog of sotatercept.

反復投与毒性試験における所見

反復投与毒性試験において、sotatercept の毒性プロファイルを評価したときの曝露量は、ラットで最大25,300 μg·hr/mL（$AUC_{0\text{-}168h}$、MRHD での臨床曝露量の最大18倍）、カニクイザルで最大165,039 μg·hr/mL（$AUC_{0\text{-}336h}$、MRHD での臨床曝露量の最大60倍）であった。反復投与毒性試験で特定された標的器官は、腎臓、脈絡叢、血液（RBC、HGB 及び HCT の増加）、心臓、副腎及び精巣輸出管／精巣であった。

ラット及びサルにおいて、膜性増殖性糸球体腎炎あるいは間質の炎症／線維化／細胞過形成を特徴とする腎毒性が認められた。ラットを用いた3ヵ月間投与試験において、0.3 mg/kg Q1W（曝露量は MRHD での臨床曝露量の0.4倍）以上の用量群で sotatercept と関連する腎毒性がみられ、30 mg/kg Q1W 群では尿中の腎障害バイオマーカーであるオステオポンチン、リポカリン-2及びアルブミンの増加を伴った。サルを用いた3ヵ月間投与試験では、30 mg/kg Q2W（曝露量は MRHD での臨床曝露量の32倍）以上の用量群で糸球体における膜性増殖性の変化が認められた。9ヵ月間投与毒性試験ではさらに進行し、10 mg/kg Q4W（曝露量は MRHD での臨床曝露量の6倍）以上の用量群で線維化を伴う間質の炎症、基質沈着の増加、小型の糸球体係蹄の発現頻度増加が認められた。サルを用いた27週間反復投与毒性試験では、30 mg/kg Q2W 以上の用量群で用量制限腎毒性（臨床症状、臨床病理学的検査値の変化及び組織形態学的変化）が認められ、このときの sotatercept の曝露量は MRHD での臨床曝露量の32倍以上であった。ラット及びサルにおける腎毒性に対する NOAEL は、それぞれ3 mg/kg Q1W 及び2.6 mg/kg Q4W であり、このときの曝露量は MRHD での臨床曝露量の2倍であった。

脳では、sotatercept と関連する組織形態学的変化がサルの脈絡叢でのみ認められた。サルで認められた脈絡叢の変化は、軽微から軽度の単核細胞浸潤あるいは軽微から軽度の泡沫状マクロフ

ァージの血管周囲への蓄積であり、30 mg/kg Q2W の用量で27週間投与、又は2.6 mg/kg Q4W 以上の用量で9ヵ月間投与（曝露量は MRHD での臨床曝露量のそれぞれ32倍又は2倍以上）したときには軽微な動脈内膜の肥厚を伴った。これらの病理組織学的所見の程度は低く、CNS と関連する臨床症状又は神経学的検査所見を伴わないことから、脈絡叢の所見は有害ではないと考えられた。

サルの腎臓及び脳について、組織の変化に対する ADA の潜在的影響を評価するため IHC 及び TEM 検査を実施した。免疫複合体沈着と一致する1種類以上の免疫蛋白質（IgG、IgM あるいは C3）が、腎臓（腎糸球体のメサンギウム、上皮下あるいは内皮下）及び脈絡叢（小動脈あるいは細動脈分枝点の内膜あるいは中膜）に確認された。しかし、sotatercept のヒト ActRIIA 部分又はヒト IgG Fc 部分は確認できず、これらの組織における TEM 検査所見は免疫複合体沈着と一致しなかった。したがって、免疫複合体に sotatercept が含まれているという確証は得られなかった。ラットの腎臓を用いた同様の IHC 及び TEM 検査は実施していない。ただし、ADA 陰性ラットでは ADA 陽性ラットと比較して腎糸球体病変の発現頻度が高かった。以上より、これらのデータは、腎臓及び脈絡叢の変化が ADA と関連する免疫複合体沈着に起因するものではないこと及びこれらの器官毒性が sotatercept の直接的な影響によるものである可能性があることを強く示唆している。重要なこととして、sotatercept の臨床試験において腎機能パラメータの変化は認められていない。

ラット及びサルを用いた全ての反復投与毒性試験で、sotatercept による有害ではない赤血球パラメータの軽微な増加が認められた。0.3 mg/kg Q1W 以上を皮下投与したラット、1 mg/kg Q4W 以上を皮下投与したサル及び1 mg/kg Q1W 以上を静脈内投与した両種において、RBC、HGB、HCT あるいは網状赤血球の軽度な増加が認められ、ときに骨髄内の骨髄球系／赤芽球系細胞比の軽微な低下を伴ったが、いずれも最長3ヵ月間の回復期間後に回復傾向を示した。循環血中の白血球パラメータは概して対照値と同程度であった。赤血球の成熟に対する sotatercept の影響は、アクチビン A 及び GDF-11の阻害に関連したものである[4.3: 084N7D]。有害ではない赤血球系の変化に対する NOAEL は、ラットを用いた3ヵ月間投与試験で30 mg/kg Q1W 以上（75,900 µg·hr/mL 以上）、サルを用いた9ヵ月間投与試験で10 mg/kg Q2W 以上（51,833 µg·hr/mL 以上）でいずれも各試験で評価した最高用量であり、曝露量は MRHD での臨床曝露量のそれぞれ18倍以上及び13倍以上であった。

Sotatercept の投与により、有害ではない心臓重量の減少、有害な副腎及び精巣に対する影響がラットでのみ認められたが、ヒトで認められる可能性は低いと考えられる。

心臓重量の減少は、急速に成長している若齢ラットに sotatercept を0.3 mg/kg Q1W（曝露量は MRHD での臨床曝露量の0.4倍）以上の用量で1ヵ月間静脈内投与、又は3ヵ月間皮下投与したとき、及び幼若ラットに0.3 mg/kg Q1W 以上の用量で生後7日目から91日目まで投与したときに認められた。ラットにおけるこれらの器官重量の変化と関連する組織形態学的所見は認められず、サルを用いた9ヵ月間投与試験では、最大51,833 µg·hr/mL の曝露量（MRHD での臨床曝露量の最大

13倍）において心臓に対する影響（心電図及び血圧パラメータ、重量、又は病理組織学的所見）が認められなかったため、ラットにおける心臓重量の減少は有害ではないと考えられた。

アクチビンシグナル伝達は、ラット及びヒト以外の霊長類の出生後の副腎リモデリングにおいて重要である。急速に成長している若齢ラットで認められ、思春期のサルで認められなかった副腎の変化は、このシグナル伝達過程の阻害によるものと考えられた。副腎毒性はラットのみでみられ、静脈内投与（10 mg/kg 以上を単回投与又は1 mg/kg Q1W 以上を1ヵ月間投与）、皮下投与（0.3 mg/kg Q1W 以上を3ヵ月間投与）及び幼若ラットを用いた重要な試験において1 mg/kg Q1W 以上を生後7日目から91日目までに皮下投与したときに認められた。用量及び投与経路に応じて様々な副腎の変化が認められ、副腎重量の増加、皮質の肥大、軽度の限局性／びまん性の皮質のうっ血、鉱質沈着及び一部の動物において皮質あるいは髄質内の壊死を伴う変色／病巣の剖検所見などがみられた。副腎の変化と関連する血液生化学的検査値の変化又は臨床症状は認められなかった。ラットを用いた重要な3ヵ月間皮下投与試験において、副腎の変化は可逆的であり、副腎の変化に対する NOAEL は3 mg/kg Q1W（全身曝露量は MRHD での臨床曝露量の2倍）であった。副腎リモデリングには、ActRIIA を介したアクチビンのシグナル伝達が関与すると考えられる[4.3: 085NQV][4.3: 080SJ4]。毒性試験に用いた動物の年齢に基づき、未成熟ラットでは sotatercept により副腎の成熟が阻害されたのに対し[4.3: 080SJ4]、生後1年以内にこの成熟プロセスが完了するカニクイザルでは阻害の影響を受けなかったと考えられる[4.3: 085JLW]。

生殖発生毒性試験における所見

アクチビン A 及び B は、正常な生殖及び発生に必要な多様な生理学的過程において重要な役割を果たしている[4.3: 080SJ7]。アクチビン A あるいは B は視床下部－下垂体－性腺系では FSH シグナル伝達を調節し、生殖器へは直接的に作用する[4.3: 080SJ7]。以下に考察するように、sotatercept の動物への投与により精巣輸出管／精巣毒性、雌雄受胎能の障害、着床前及び着床後胚損失率の上昇並びに胎児／出生後の成長及び成熟の遅延を含む生殖及び発生に対する有害な影響が認められ、これらは ActRIIA シグナル伝達の低下と機序的に一致するものであった。

Sotatercept を投与したラットで認められた精巣毒性は、精巣輸出管における流出路閉塞であった。同様の影響は、ActRIIA シグナル伝達が低下したフォリスタチン過剰発現マウスの精巣輸出管で報告されている[4.3: 085GS4]。精巣輸出管の解剖学的構造の違いから、ヒトで精巣輸出管の閉塞及び二次的な精巣毒性が認められる可能性は低いと考えられる。3ヵ月間皮下投与毒性試験及び雄受胎能試験の雄ラットにおいて、sotatercept の投与による精子形成低下／無精子症、精子肉芽腫、あるいは精巣の変性／委縮が認められた。雄受胎能試験[2.6.6.6.1.1 項]の0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で認められた精子、精巣及び精巣上体に対する影響は、精巣輸出管における流出路閉塞による二次的なものと考えられた。これらの用量依存的な組織形態学的変化に起因して、30 mg/kg Q1W（全身曝露量は MRHD での臨床曝露量の20倍）群では、可逆的ではあるが有害な精子濃度の低下及び受胎率の低下が認められた。したがって、雄ラットにおける受胎能の機能的変化に対する NOAEL は3 mg/kg Q1W（全身曝露量は MRHD での臨床曝露量の2倍）であった。

Sotatercept の反復投与毒性試験に用いたサルの多くが性成熟していなかったため、利用可能なサルのデータからは霊長類の精巣に対する影響に関する情報は得られない。なお、ラット及びヒトの精巣輸出管には構造的な相違があるため、ヒトにおいて精巣輸出管の閉塞により精巣毒性が生じるリスクは低い。ラットの精巣輸出管は長く、精巣上体に入る単一の管に吻合するが[4.3: 085GRJ][4.3: 085GSC]、ヒトの精巣輸出管ははるかに短く、単一の管に吻合することはなく複数の管により精巣上体に入る[4.3: 085GRV][4.3: 085GS3]。このためヒトでは、複数の精巣輸出管の閉塞又は体液の再吸収の阻害にかかわらず体液の流出が生じる。

雌ラットに交配前から着床まで継続的に sotatercept を皮下投与したとき、50 mg/kg 群では後肢の腫脹／一部の母動物の早期安楽殺、性周期の延長及び交尾率の低下が認められ、15 mg/kg 以上の用量群では受胎率及び妊孕率の低下、妊娠子宮重量の減少、並びに生存胚数の減少（着床前及び着床後胚損失率の上昇に起因）が認められた。母動物に対する NOAEL は15 mg/kg、ラットにおける雌受胎能及び初期胚発生に対する NOAEL は5 mg/kg であり[2.6.6.6.1.2 項]、それぞれ MRHD での臨床曝露量の9倍及び2倍の曝露量であった。

EFD 毒性試験では、sotatercept を妊娠ラットに妊娠6日目及び13日目、又は妊娠ウサギに妊娠7日目及び14日目に皮下投与した。いずれの動物種においても催奇形性は認められなかった。妊娠ラットでは、sotatercept の投与による着床後胚損失率の上昇、後期胎児死亡率の上昇、生存同腹児数の減少、胎児体重の減少、骨化遅延、並びに胸椎及び腰椎数の増加／減少を伴う過剰肋骨の発現率上昇を反映した骨化点数の変化が認められた。ラットにおける母動物に対する NOAEL は 50 mg/kg、発生に対する NOAEL は5 mg/kg であり、曝露量は MRHD での臨床曝露量のそれぞれ15倍及び2倍であった。妊娠ウサギにおける発生に対する影響はラットで認められた所見と類似しており、着床後胚損失率の上昇、生存胎児数の減少、胎児体重の減少及び骨化点数の減少がみられた。ウサギにおける母動物に対する NOAEL は5 mg/kg、発生に対する NOAEL は0.5 mg/kg であり、曝露量は MRHD での臨床曝露量のそれぞれ4倍及び0.4倍であった。

雌受胎能試験並びにラット及びウサギの EFD 毒性試験で認められた発生及び生殖への影響は、sotatercept を介した ActRIIA シグナル伝達の阻害と機序的に一致する。アクチビン A あるいは B は卵巣の濾胞形成に影響し、妊娠の成立及び維持に関与する[4.3: 08DF5Q][4.3: 080SJ7][4.3: 08DJNP][4.3: 08DF5M]。アクチビン[4.3: 080SJ7][4.3: 08DJNP][4.3: 08DF5M]及び BMP[4.3: 08DF5J]は ActRIIA を介してシグナル伝達を行うが、これらは子宮内膜受容性及び胚着床の重要な調節因子でもある。胚あるいは胎児発生では、ActRIIA シグナル伝達は軟骨及び骨の形成／成長中に生じ[4.3: 08DL7H]、アクチビン A シグナル伝達は成長の制御に重要である[4.3: 08DF5P]。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験において、ADA の発現を最小限に抑えるため、妊娠期（妊娠6日目及び13日目）又は授乳期（授乳1日目、8日目及び15日目）の母動物に sotatercept を投与した。ラットの授乳期に sotatercept を投与したとき、母動物における摂餌量の減少、並びに F_1出生児の体重／体重増加量の減少及び性成熟の遅延が認められた。乳汁を介して sotatercept に曝露された出生児で認められた体重増加量（成長）の減少及び性成熟の遅延も、

アクチビン A シグナル伝達の阻害と一致するものである[4.3: 08DF5P]。母動物の妊娠期に sotatercept を投与し、授乳期には投与を実施しなかった場合、F_1出生児に同様の影響は認められなかった。授乳期に投与した母動物に対する NOAEL は10 mg/kg Q1W（曝露量は MRHD での臨床曝露量の4倍）であった。F_1出生児の生存、行動及び成長に対する NOAEL は、sotatercept を母動物の妊娠又は授乳期に投与したとき、それぞれ5 mg/kg Q1W 又は1.5 mg/kg Q1W（曝露量は MRHD での臨床曝露量のそれぞれ2倍又は0.6倍）であった。

幼若動物毒性試験における所見

2つの独立した幼若ラットを用いた試験において、sotatercept を3 mg/kg Q1W 以上の用量で生後7日目から91日目まで投与したときの忍容性は低かった。Sotatercept を投与したラットでは成長率（体重増加量）の低下及び性成熟の遅延が認められた。また、全生存用量群で認められた不可逆的な腎臓及び精巣の変化は、成熟ラットで認められた所見と同様であった[2.6.6.6.4 項]。いずれの幼若動物試験においても、投与期間終了後に交配したときに受胎率及び妊娠率の低下が認められた。幼若動物を用いた毒性試験における成長及び成熟への影響[4.3: 08DF5P]並びに生殖への影響[4.3: 080SJ7]は、いずれも若齢動物におけるアクチビン A シグナル伝達の阻害と一致するものであった。投与期間終了時及び回復期間中においても、イムノフェノタイピング検査で免疫抑制を示唆する所見は認められず、sotatercept を投与した幼若ラットが KLH に対する適切な免疫応答を示したことから、sotatercept は免疫毒性を示さないことが示唆された。重要な幼若動物毒性試験における NOAEL は1 mg/kg Q1W 未満であり、このときの曝露量は MRHD での臨床曝露量の2倍未満であった。

結論

動物における sotatercept の毒性プロファイルを包括的に評価した。Sotatercept を投与したラット及びサルで腎毒性が認められたものの、これまでに実施された臨床試験において腎障害のエビデンス（血清中尿素窒素及びクレアチニン、並びに尿中アルブミン／クレアチニン比を用いてモニタリング）はみられていない。成熟及び幼若ラットで心臓重量及び副腎の変化が認められたものの、ラットで心臓重量の変化と関連する病理組織学的所見はみられず、sotatercept を最長9ヵ月間投与したサルでは、最大51.833 µg·hr/mL の曝露量（$AUC_{0\text{-}504h}$、MRHD での臨床曝露量の最大13倍）において心血管系に対する機能的影響（心電図及び血圧）、電解質の変化、又は心臓若しくは副腎の剖検所見はみられなかった。Sotatercept と関連する生殖及び発生に対する影響として、ヒトで認められる可能性は低いと考えられる精巣輸出管／精巣の組織形態学的変化、ラット及びウサギ胎児における骨化遅延、ラット胎児における骨化と関連する構造変異の発現頻度の増加、ラット及びウサギにおける着床前及び着床後胚損失率の上昇、並びに授乳期に曝露したラットの出生児における発育遅延が認められ、これらはいずれも生殖及び発生における TGF-β スーパーファミリーリガンドの広範な作用に関連する影響であると考えられた。

以上より、sotatercept の非臨床プロファイルは、WHO 分類第1群である PAH の成人患者を対象とする予定臨床用量での安全な使用を支持するものである。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 Sprague-Dawley ラットを用いた sotatercept（10及び30 mg/kg）及び対照物質の単回静脈内投与試験（TT #[redacted]-7825）

[4.2.3.1.1: TT[redacted]7825]

ラットを用いた4週間静脈内投与毒性試験（TT #[redacted]-7846）（[2.6.6.3.2.1 項]参照）で副腎が標的器官であることが確認され、sotatercept と関連する副腎毒性の時間経過を評価する目的で、雌 Sprague Dawley ラットを用いた GLP 非適用の探索的単回静脈内投与試験を実施した[2.6.7.5 項]。

対照群に12匹、sotatercept 投与群に14匹の雌 Sprague-Dawley ラットを割り付け、媒体のみ、又は PBS で調製した sotatercept を10若しくは30 mg/kg の用量で単回静脈内投与した。投与容量は試験1日目の個々の体重に基づき算出した。評価項目は病理学的検査に限定した。試験8日目及び28日目に各群の半数の動物（6匹／対照群及び7匹／sotatercept 投与群）を安楽殺して副腎、肝臓、腎臓及び膵臓を採取し、副腎の病理組織学的検査を実施した。

被験物質と関連する剖検所見又は器官重量の変化は認められなかった。試験8日目には、被験物質と関連する副腎の組織形態学的変化は認められなかった。一方で試験28日目には、副腎の鉱質沈着を伴う中等度の皮質壊死が10 mg/kg 群の7匹中1匹、30 mg/kg 群の7匹中3匹で認められた。本所見は副腎皮質横断面の約30%～70%を占めており、いずれも両側性であった。本所見は索状帯又は網状帯に集中して認められ、球状帯には全く認められなかった。検査した切片で様々に認められた副腎髄質に所見は認められなかった。本試験の条件下では、NOEL は得られなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 ラット皮下投与

2.6.6.3.1.1 ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7823）

[4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]

本 GLP 適用試験の目的は、雌雄 Sprague-Dawley ラットに sotatercept を Q1W で3ヵ月間皮下投与したときの毒性を評価することであった[2.6.7.7.A 項]。また、本試験では1ヵ月間の回復期間を設け、投与と関連する毒性の回復性についても評価した。

Sprague-Dawley ラット（各群雌雄各15匹）に、PBS で調製した sotatercept を0.3、3若しくは30 mg/kg の用量で、又は媒体のみを Q1W で3ヵ月間皮下投与した（計13回投与）。Sotatercept の

投与容量は0.7～1.15 mL/kg とした。各群雌雄各5匹のラットを1ヵ月間の回復期間にわたって維持した。初回投与時にラットは約6～8週齢であった。

毒性の評価は、死亡、症状観察、体重、摂餌量、ステロイドホルモン測定（雌のみ）、並びに臨床病理学的及び病理学的検査に基づき実施した。また、sotatercept の血清中濃度の測定（sotatercept 投与群）及び免疫原性（ADA）の評価（対照群及び sotatercept 投与群）を実施した。

被験物質と関連する計画外の死亡、臨床症状、又は体重、尿検査値若しくは FSH 値の変化は認められなかった。

投与期間中に、0.3 mg/kg Q1W 以上の雌で被験物質と関連する摂餌量の増加が認められたが、体重への影響はみられなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。投与期間終了時（試験90日目）に、被験物質の薬理学的作用を介した血液学的検査値の変化として、概して0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で循環血中赤血球量を示すパラメータ（RBC、RDW あるいは HGB）の軽度の増加、並びに MCV 及び MCH の減少、3 mg/kg Q1W 以上の用量群で網状赤血球の増加、あるいは30 mg/kg Q1W 群で MPV の増加が認められたが、これらはいずれも有害ではないと考えられた。血液生化学的検査所見は、30 mg/kg Q1W 群における BUN の軽微な増加（背景対照値の範囲内）のみであった。

試験90日目に剖検した動物のうち、3 mg/kg Q1W 以下の用量群で認められた病理学的所見は、発現頻度が低いこと、並びに所見の特徴及び程度に基づき有害ではないと考えられた。皮下投与部位における sotatercept 投与液の忍容性は良好であった。0.3 mg/kg Q1W 以上の雌雄に認められた心臓重量の減少及び30 mg/kg Q1W 群の雌でみられた肝臓重量の増加は、関連する病理組織学的所見を伴わないことから、いずれも有害ではないと考えられた。被験物質と関連する精巣に対する影響として、0.3 mg/kg Q1W 群（1匹）及び30 mg/kg Q1W 群で軽微から中等度の精子形成低下、3 mg/kg Q1W 群（1匹）で精巣上体の腫瘤及び精巣／精嚢腺の小型化と関連する軽微な単核細胞浸潤及び多核巨細胞を伴う無精子症、並びに30 mg/kg Q1W 群で精巣に軽度な片側性かつ多巣性の萎縮が認められた。副腎皮質においては、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で軽度の限局性又はびまん性のうっ血がみられ、30 mg/kg Q1W 群では副腎皮質の多巣性の鉱質沈着及び副腎重量の増加が認められた。腎臓における所見として、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で軽微な膜性又は膜性増殖性糸球体腎炎及び軽微から軽度の好塩基性尿細管の増加が認められた。30 mg/kg Q1W 群では尿細管の拡張、間質の線維化あるいは単核炎症性細胞浸潤を伴う軽度／軽微な限局性の尿細管の変性／萎縮が認められ、これらは30 mg/kg Q1W 群で剖検時にみられた腎臓近傍の体液貯留及び腎臓重量の減少と関連していた。これらの腎臓の変化は当初、ADA 産生に伴う二次的な免疫複合体沈着によるものと考えられたが、追加で実施した評価[2.6.6.3.1.2 項]から、sotatercept 投与時の腎毒性は直接的な影響であることが示唆される。

回復期間中及び回復期間後の剖検時（試験120日目）に認められた被験物質と関連する所見は、30 mg/kg Q1W 群の雄5匹中2匹で認められた精巣の片側性かつびまん性又は中等度の局所拡大性

の無精子症に限られ、これらは投与期間中に認められた精巣の変化と一致した。心臓重量、並びに副腎及び腎臓の変化は、全用量群で回復期間後に回復した。

血清中 sotatercept 濃度の測定は、試験7日目（初回投与後）、14日目、28日目、56日目、84日目及び90日目（最終投与後）の投与前（トラフ時）、並びに試験120日目（回復期間終了時）に実施した。検体数が限られていたため、TK データには AUC 及び C_{max} は含めなかった。一部の時点における平均血清中濃度データを示す[表 2.6.6-2]。

表 2.6.6-2　皮下投与後のラットの平均（±SD）血清中 sotatercept 濃度（試験 7 日目、90 日目及び 120 日目）（TT #[redacted]-7823）

Timepoint	0.3 mg/kg Q1W[a]	3 mg/kg Q1W[b]	30 mg/kg Q1W[c]
Study Day 7 (µg/mL)	2.37 ± 0.336	29.61 ± 5.03	132.80 ± 56.84
Study Day 90 (µg/mL)	2.96 ± 2.88	11.27 ± 17.60	118.04 ± 106.91
Study Day 120 (µg/mL)	0.51 ± 1.15	0.98 ± 1.82	2.38 ± 3.44

BLQ=below limit of quantification; Q1W=once weekly; SD=standard deviation.

a At 0.3 mg/kg Q1W, Study Day 90 trough concentrations were similar to or greater than Study Day 7 values in 6/10 animals. Beginning on Study Day 56, 4 animals were near or BLQ.

b At 3 mg/kg Q1W, Study Day 90 trough concentrations were similar to Study Day 7 values in 3/10 animals. Beginning on Study Day 28, 5 animals were near or BLQ. In remaining animals, serum concentrations were highly variable throughout the dosing period.

c At 30 mg/kg Q1W, Study Day 90 trough concentrations were similar to or greater than Study Day 7 values in 4/10 animals. Beginning on Study Day 28, 2 animals were BLQ for the remainder of the study. In remaining animals, serum concentrations were highly variable throughout the dosing period.

投与期間中に測定した血清中濃度は、各用量群の個体間で変動が大きかった。これらの変動は、一部の動物における ADA の発現によるものと考えられた。ELISA 法により陽性対照の閾値を上回る値を示した総 ADA 反応陽性率は、sotatercept 投与群の88匹中51匹（58%）であった。特異性アッセイに基づく ADA 反応陽性率は83匹中7匹（8.4%）であった。回復期間まで評価した個々の動物の薬物動態及び ADA データを比較したところ、投与期間中に sotatercept 濃度が定量下限未満であった動物と、ELISA 法で ADA 陽性の値を示した動物との間には、免疫原性（ADA）アッセイにおける特異性の有無にかかわらず高い相関が認められた。

結論として、被験物質と関連する有害な所見は30 mg/kg Q1W 群でのみ認められ、腎臓の尿細管間質及び糸球体における変化、副腎皮質の鉱質沈着、並びに精巣の萎縮又は精子形成低下がみられた。心臓重量、並びに副腎及び腎臓の変化は、全用量群で回復期間後に回復した。一方、30 mg/kg Q1W 群で認められた精巣の所見は不可逆的であった。糸球体腎炎は当初、免疫原性（ADA）と関連する免疫複合体沈着によるものと考えられたが、その後のラットを用いた試験で sotatercept の直接的な毒性であることが示唆された[2.6.6.3.1.2 項]。本試験条件下において、3 mg/kg Q1W 以下の用量で認められた影響は有害ではなく、完全に回復したことから、NOAEL は3 mg/kg Q1W であり、推定 $AUC_{0\text{-}168h}$ は2,090 µg·hr/mL であった（TT #[redacted]-7833の TK データに基づく）。

2.6.6.3.1.2 ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与トキシコキネティクス試験（TT #[redacted]-7833）

[4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]

本 GLP 適用試験の目的は、Sprague-Dawley ラットに sotatercept を Q1W で3ヵ月間皮下投与した後、1ヵ月間の回復期間を設けたときの TK 及び免疫原性（ADA）を評価し、腎臓の変化をモニタリングするための腎毒性の尿中バイオマーカーの有用性を明らかにすることであった [2.6.7.7.B 項]。

Sprague-Dawley ラット（各群雌雄各16匹）に、[redacted]を含む注射用滅菌水（米国薬局方収載品、[redacted]）で調製した sotatercept を0.3、3若しくは30 mg/kg の用量で、又は媒体のみを Q1W で3ヵ月間皮下投与した（計14回投与）。投与容量は1 mL/kg とした。TK／免疫原性（ADA）評価のための検体採取用として、各群雌雄各6匹のラットを1ヵ月間の回復期間にわたって維持した。初回投与時にラットは約8週齢であった。

毒性の評価は、死亡、症状観察、体重、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液生化学的検査、尿中バイオマーカー検査）、並びに腎臓の剖検及び病理組織学的検査に基づき実施した。また、sotatercept の血清中濃度の測定（対照群及び sotatercept 投与群）及び ADA の評価（sotatercept 投与群）を実施した。

被験物質と関連する計画外の死亡はなかった。30 mg/kg Q1W 群の雄1匹で試験57日目に死亡が確認された。この個体における試験29日目の血液学的検査値及び血液生化学的検査値（クレアチニン及び BUN）の変化は、ほかの30 mg/kg Q1W 群の個体における変化と類似しており、腎臓の剖検又は病理組織学的検査で死因が明らかにならなかったため、死亡と投与の関連は不明であった。

投与期間中に認められた被験物質と関連する臨床症状は、30 mg/kg Q1W 群の2匹における腹部膨満のみであった。0.3 mg/kg Q1W 以上の雌では、投与期間中に平均体重の軽微な増加が認められ、30 mg/kg Q1W 群の雌では回復期間を通して増加した。

試験29日目あたりから試験93日目まで継続してみられた被験物質の薬理学的作用を介した血液学的検査値の変化は、概して0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群における循環血中赤血球量を示すパラメータ（RBC、HCT 及び HGB）の軽度の増加、RDW 及び網状赤血球の増加、並びに MCH、MCHC あるいは MCV の減少、30 mg/kg Q1W 群における血小板の減少であり、いずれも毒性学的意義は低かった。これらの所見の多くは、0.3 mg/kg Q1W 以上の雄及び30 mg/kg Q1W 群の雌で回復期間を通して認められた。被験物質と関連する血液生化学的検査値の変化は認められなかった。

Sotatercept を投与したラットにおいて、腎障害の尿中バイオマーカーであるオステオポンチン、リポカリン-2及びアルブミンの用量及び時間依存的な増加傾向が認められた。投与期間終了時

（試験93日目）には、主に30 mg/kg Q1W 群でオステオポンチン及びリポカリン-2の中等度の増加（対照群の最大約5倍）が認められた。アルブミンの増加（対照群の最大約50倍）は、30 mg/kg Q1W 群において回復期間終了時（試験121日目）に最も顕著に認められた。

投与期間終了時（試験93日目）に、30 mg/kg Q1W 群の2匹に認められた左腎の肥大（腎被膜内の体液貯留に起因）は、軽微から軽度の嚢胞性拡張及び腎被膜の線維化を伴っていた。3 mg/kg Q1W 以上の雄及び0.3 mg/kg Q1W 以上の雌において、軽微から中等度の膜性増殖性糸球体腎炎が認められた。3 mg/kg Q1W 以上の雌で軽微から軽度の慢性進行性腎症が認められ、30 mg/kg Q1W 群の雌雄で軽微から軽度の間質の鉱質沈着が認められた。

回復期間終了時（試験121日目）には、投与期間終了時に認められた腎臓の剖検所見及び病理組織学的所見は回復しておらず、0.3 mg/kg Q1W 以上の雌雄で軽微から中等度の慢性進行性腎症が認められた。なお、3 mg/kg Q1W 以下の用量群では顕著な腎臓のバイオマーカーの変化はみられず、病理組織学的所見の程度及び発現頻度が低かったため、3 mg/kg Q1W 以下の用量群でみられた腎臓の変化は有害ではないと考えられた。

TK パラメータを[表 2.6.6-3]に示す。AUC 又は C_{max} に一貫した性差は認められなかった。したがって、いずれのデータも雌雄合算値を示す。

表 2.6.6-3　皮下投与後のラット血清中 sotatercept の平均（±SE）TK パラメータ：試験 1 日目及び 92 日目（TT #[redacted]-7833）

Study Day	Parameter[a,b]	0.3 mg/kg Q1W	3 mg/kg Q1W	30 mg/kg Q1W
1	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	233 ± 8.75	2170 ± 112	20,400 ± 2740
	C_{max} (µg/mL)	1.65 ± 0.120	16.1 ± 1.05	179 ± 46.4
92	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	610 ± 46.2	2090 ± 594	25,300 ± 2650
	C_{max} (µg/mL)	3.94 ± 0.390	14.2 ± 5.80	162 ± 8.85

ADA=anti-drug antibody(ies); $AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; Q1W=once weekly; SE=standard error; TK=toxicokinetic(s).

a Parameters include values from ADA negative and ADA positive animals.

b Sotatercept levels in control samples were all BLQ (0.04 µg/mL).

概して ADA 陽性動物では sotatercept 濃度が低かった。TK 動物の血清中 sotatercept 濃度は、3 mg/kg Q1W 群では試験92日目に ADA 陽性動物の4匹中2匹、試験121日目に5匹中3匹で定量下限未満であった。30 mg/kg Q1W 群では ADA 陽性を示したのは1匹のみであり、この個体の血清中濃度は試験92日目以降では定量下限未満であった。

主試験動物の剖検時（試験93日目）における血清中 sotatercept 濃度は、TK 動物の試験92日目における投与後24時間の濃度と同程度であった。なお、sotatercept 濃度が定量下限未満であった ADA 陽性動物は、0.3 mg/kg Q1W 群及び3 mg/kg Q1W 群でそれぞれ5匹中4匹及び13匹中7匹であった。主試験動物のうち30 mg/kg Q1W 群では、sotatercept 濃度は ADA 陽性動物で顕著に低下し

た。試験92／93日目における ADA 発現率は、0.3 mg/kg Q1W 群、3 mg/kg Q1W 群及び30 mg/kg Q1W 群でそれぞれ19%、65%及び28%であった。

反復投与後の血清中 sotatercept 濃度は、一部の sotatercept 投与群で増加した。試験1日目に対する試験92日目の $AUC_{0\text{-}168h}$ 比は、0.3 mg/kg Q1W 群、3 mg/kg Q1W 群及び30 mg/kg Q1W 群の雄でそれぞれ3.1、1.4及び1.7、雌でそれぞれ2.3、0.55及び0.92であった。試験92日目の検体中に認められた ADA により、3 mg/kg Q1W 群及び30 mg/kg Q1W 群における蓄積比が低下したと考えられる。

全ての sotatercept 投与群で認められた糸球体の変化と ADA の発現との関連性は確認できず、むしろ尿中アルブミンの増加及び糸球体腎炎は概して ADA 陰性動物で認められた。また、糸球体の変化は試験93日目における血清中 sotatercept 濃度の増加と関連していたことから、糸球体の変化は sotatercept の直接的な影響によるものであり、免疫複合体沈着は関与していないと考えられた。

結論として、sotatercept を0.3、3又は30 mg/kg Q1W の用量で3ヵ月間連続投与したとき、先に同用量で実施したラットを用いた3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7823）[2.6.6.3.1.1 項]と同程度の血清中濃度（試験92日目）において、体重及び臨床病理学的検査値の変化、並びに不可逆的な腎臓の変化が認められた。ラットを用いた3ヵ月間投与試験の NOAEL はいずれも3 mg/kg Q1W（$AUC_{0\text{-}168h}$ は2,090 μg·hr/mL）であった。本試験において、腎障害の尿中バイオマーカーであるオステオポンチン、リポカリン-2及びアルブミンの増加は、概して30 mg/kg Q1W 群でみられた有害な腎毒性と関連していた。3 mg/kg Q1W 以下の用量群でみられた腎臓の所見は、病理組織学的所見の発現頻度及び程度が低かったことから有害ではないと考えられた。また、糸球体毒性は ADA 陰性動物において最も顕著に認められ、sotatercept が腎臓に対して直接的な毒性を示す可能性が示唆された。

2.6.6.3.2 ラット静脈内投与

2.6.6.3.2.1 雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いた4週間の回復期間を伴う週1回4週間静脈内投与毒性試験（TT #[redacted]-7846）

[4.2.3.2.3: TT[redacted]7846]

本 GLP 適用試験の目的は、雌雄 Sprague-Dawley ラットに sotatercept を Q1W で4週間静脈内投与したときの毒性を評価することであった[2.6.7.6 項]。

Sprague-Dawley ラット（各群雌雄各15匹）に、PBS で調製した sotatercept を1、10若しくは30 mg/kg の用量で、又は媒体のみを Q1W で4週間静脈内投与した（計4回投与）。投与容量は3 mL/kg とし、1分間かけて尾静脈内投与した。各群雌雄各5匹のラットを4週間の回復期間にわたって維持した。初回投与時にラットは約8～12週齢であった。

毒性の評価は、死亡、症状観察、体重、摂餌量、並びに臨床病理学的及び病理学的検査（骨髄塗抹標本及び雄生殖能の評価を含む）に基づき実施した。Sotatercept 投与群の検体を用いてsotatercept の血漿中濃度及び ADA を測定した。

計画外の死亡が2匹でみられたが、投与との関連は不明であった。10 mg/kg Q1W 群の雄1匹は、試験18日目に血尿が認められ、試験19日目に死亡が確認された。30 mg/kg Q1W 群の雄1匹は、試験23日目に瀕死状態のため安楽殺した。30 mg/kg Q1W 群の瀕死状態の雄で認められた血液学的検査値の変化及び多くの病理学的所見は、試験29日目の計画剖検時に30 mg/kg Q1W 群の動物で認められた所見と一致した。計画外の死亡動物の死因又は瀕死状態の原因は不明であった。

被験物質と関連する臨床症状、又は体重、摂餌量若しくは尿検査値の変化は認められなかった。

試験29日目において、被験物質の薬理学的作用を介した血液学的検査値の変化として、概して1 mg/kg Q1W 以上の用量群で循環血中赤血球量を示すパラメータ（RBC、HCT 及び HGB）の軽度の増加が認められた。これらの変化は、骨髄塗抹標本の定性的及び定量的病理組織学的評価により10 mg/kg Q1W 以上の雄及び1 mg/kg Q1W 以上の雌で認められた総 RBC の軽度の増加（対照群と比較して）を伴った。その他の血液学的検査値の変化として、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で網状赤血球の軽度の増加、雄で好塩基球の軽度の増加（10 mg/kg Q1W 群のみ）及び大型非染色細胞数の軽度の増加（10 mg/kg Q1W 以上の用量群）、並びに1 mg/kg Q1W 以上の用量群で MCH、10 mg/kg Q1W 以上の用量群で MCHC 及び10 mg/kg Q1W 以上の雄で血小板の軽度の減少が認められたが、これらの変化はいずれも毒性学的意義が低かった。10 mg/kg Q1W 以上の用量群では、RBC、HGB 及び HCT の軽度の増加、並びに MCH の減少が1ヵ月間の回復期間を通して認められた。回復期間終了時には、これらの変化と関連する骨髄の病理組織学的所見は認められなかった。血液学的検査値の変化及び骨髄所見はいずれも有害ではないと考えられた。

試験29日目において、10 mg/kg Q1W 群及び30 mg/kg Q1W 群の雌で ALT、AST 及び ALP のごく軽度又は軽度の増加（それぞれ対照群の2～3倍、1～2倍及び1倍の増加）が認められた。また、1 mg/kg Q1W 群の雌における AST は対照群と比較して有意に高値であった（対照群の1倍の増加）。試験29日目に雄で認められた肝酵素値の変化（10 mg/kg Q1W 群のみにおける ALT のごく軽度の増加）は雌で認められた変化よりも軽度であった。1ヵ月間の回復期間終了時（試験57日目）において、30 mg/kg Q1W 群の雌で AST 及び ALP が対照群の2倍増加した。試験57日目の雄では、10 mg/kg Q1W 群でのみ ALP が対照群の2倍増加した。これらの変化は程度が軽微であり、関連する肝臓の病理組織学的所見が認められなかったことから、肝酵素の増加は有害ではないと考えられた。その後のラットを用いた3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7823 及び TT #[redacted]-7833[2.6.6.3.1 項]）では、同様の血清／血漿中濃度において肝酵素の顕著な増加は認められなかった。

10 mg/kg Q1W 以上の用量群の精巣／精巣上体、並びに1 mg/kg Q1W 以上の用量群の膵臓及び副腎に、被験物質と関連する病理学的所見が認められた。10 mg/kg Q1W 以上の用量群で卵巣重量の増加、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で心臓重量の減少、10 mg/kg Q1W 以上の用量群で腎臓重

量の減少及び30 mg/kg Q1W 群で子宮重量の減少が認められたが、いずれも関連する病理組織学的所見を伴わないことから、有害ではないと考えられた。10 mg/kg Q1W 以上の用量群の精巣で、精巣上体で肉眼的に確認された小結節／病巣と関連する精子肉芽腫が病理組織学的検査において認められた。また、精巣の変性（精細管の拡張、精細管内の精子細胞数減少、多核巨細胞）は、ときに精子肉芽腫及び平均精巣重量の増加と関連して認められた。1 mg/kg Q1W 以上の雌の副腎において、副腎重量の増加、並びに肥大／変色及び病巣の剖検所見と関連する皮質及び髄質の壊死が認められた。1 mg/kg Q1W 以上の用量群の膵臓において、概して軽微から軽度な腺房細胞のアポトーシス、チモーゲン顆粒の枯渇及び膵腺房の萎縮が認められた。全用量群で認められた膵臓の変化は程度が低く、腺房細胞のアポトーシスは対照群及び sotatercept 投与群のラットにおいて認められた。また、その後のラットを用いた皮下投与試験では最大30 mg/kg Q1W において又はサルでは全用量において、同様の膵臓に対する影響が認められなかったことから、本試験で認められた膵臓の変化は sotatercept の投与と関連しないと考えられた。投与部位における sotatercept 投与液の忍容性は良好であった。

1ヵ月間の回復期間終了時（試験57日目）、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で認められた膵臓の変化は被験物質と関連しないと考えられた。また、10 mg/kg Q1W 以上の用量群で認められた心臓重量の減少、精巣上体の精子肉芽腫／精巣変性及び副腎の壊死／慢性壊死は回復性を示さなかった。

雄の生殖に関する評価において、精子パラメータの変化は概して被験物質に起因する精巣の病理組織学的所見と関連するものであった。投与期間終了時に30 mg/kg Q1W 群で精子運動性の低下、精巣上体内精子数の減少及び精子断片化の増加が認められた。回復期間終了時においては、10 mg/kg Q1W 群の5匹中2匹で精子断片化の増加及び精子運動性の低下が認められた。

初回投与後の試験2日目及び3日目、試験7日目の投与前、並びに各動物の剖検前における sotatercept の血漿中濃度を測定した。一部のデータを[表 2.6.6-4]に示す。

表 2.6.6-4　静脈内投与後のラットの平均（±SD）血漿中 sotatercept 濃度：試験 2 日目、29 日目及び 57 日目（TT #[redacted]-7846）

Dosage (mg/kg Q1W)	Study Day 2 C_{max} (µg/mL)	Study Day 29 Plasma Concentration (µg/mL)[a]	Study Day 57 Plasma Concentration (µg/mL)[b]
1	8.02 ± 1.04	9.66 ± 6.57	0.18 ± 0.11
10	83.92 ± 12.20	240.17 ± 105.84	33.41 ± 35.80
30	190.90 ± 54.39	324.41 ± 120	22.63 ± 7.19

C_{max}=observed maximum concentration; Q1W=once weekly; SD=standard deviation.
a Measured on the day of necropsy (end of the dosing period).
b Measured on the day of necropsy (end of the treatment-free period).

1 mg/kg Q1W 群、10 mg/kg Q1W 群及び30 mg/kg Q1W 群において ADA が検出された動物は、試験29日目にそれぞれ10匹中7匹、10匹中1匹及び9匹中2匹であり、試験57日目にそれぞれ10匹中4匹、10匹中0匹及び9匹中2匹であった。試験29日目から試験57日目まで持続的にみられた高い抗

体価が、sotatercept の血漿中濃度の低下に関連すると考えられた。1 mg/kg Q1W 群において、試験29日目に10匹中2匹、試験57日目に10匹中7匹で sotatercept の血漿中濃度が定量下限未満であった。

結論として、sotatercept を1、10又は30 mg/kg Q1W で4週間静脈内投与したとき、全用量群で有害な変化が認められた。1 mg/kg Q1W 以上の雌で副腎の壊死が認められ、投与との関連が不明な計画外の死亡が2匹でみられた。また、10 mg/kg Q1W 以上の用量群において精巣／精巣上体の組織形態学的変化が認められた。10 mg/kg Q1W 以上の用量群では、副腎又は精巣の変化は4週間の回復期間後に回復性を示さなかった。これらの所見に基づき、静脈内投与後の NOAEL は 1 mg/kg Q1W 未満であった。

2.6.6.3.3 サル皮下投与

2.6.6.3.3.1 カニクイザルを用いた2ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7824）

[4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]

本 GLP 適用試験の目的は、雌雄カニクイザルに sotatercept を Q2W で3ヵ月間皮下投与したときの毒性及び TK を評価することであった[2.6.7.7.C 項]。また、2ヵ月間の回復期間を設け、投与と関連する毒性の回復性についても評価した。

カニクイザル（各群雌雄各4～6匹）に、PBS で調製した sotatercept を10、30若しくは50 mg/kg の用量で、又は媒体のみを Q2W で3ヵ月間皮下投与した（計7回投与）。投与容量は低用量群の 0.20 mL/kg から対照群及び高用量群の0.98 mL/kg までとした。対照群及び高用量群の雌雄各2匹を2ヵ月間の回復期間にわたって維持した。初回投与時のサルの年齢は最高で約3歳であった。

毒性の評価は、死亡、症状観察、体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、並びに臨床病理学的及び病理学的検査に基づき実施した。また、sotatercept の血漿中濃度の測定（対照群及び sotatercept 投与群）及び ADA の評価（sotatercept 投与群）を実施した。

全ての動物が計画剖検時まで生存した。被験物質と関連する臨床症状又は体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図、凝固検査値若しくは尿検査値の変化はみられなかった。

被験物質の薬理学的作用を介した血液学的検査値の変化として、循環血中赤血球量を示すパラメータ（HGB、HCT、RBC 及び RDW を含む）及び網状赤血球の軽度の増加、並びに MCH 及び MCHC の減少が全用量群で認められたが、これらの変化の毒性学的意義は低かった。これらの変化は回復期間中に回復した。

全用量群で認められた被験物質と関連する血液生化学的検査値の変化は、クレアチニン及び BUN の軽微な増加のみであった。回復期間終了時（試験148日目）には、50 mg/kg Q2W 群の雌でのみクレアチニンの高値がみられた。全ての被験物質投与動物のクレアチニン及び BUN の値

は試験実施施設の背景対照値の範囲内であった。したがって、これらの変化は有害ではなく、毒性学的意義は低いと考えられた。

被験物質と関連する剖検所見又は器官重量の変化は認められなかった。投与期間終了時（試験92日目）の剖検において、30 mg/kg Q2W 以上の用量群で被験物質と関連する腎臓の組織形態学的変化として、軽度から中等度の糸球体における多巣性又はびまん性の膜性増殖性細胞過形成が認められ、50 mg/kg Q2W 群では二次的な尿細管の変化（皮髄の線維化、単核細胞浸潤、好塩基性尿細管の増加、尿細管の拡張）がみられた。30 mg/kg Q2W 群の投与期間終了時に剖検した動物でみられたこれらの糸球体の変化は軽度であり、8匹中4匹で認められた。また、50 mg/kg Q2W 群では、これらの変化は、投与期間終了時の剖検では全動物において軽度から中等度であり、回復期間終了時には全動物において軽度であった。回復期間後の動物でみられた病変の程度及び分布は改善したことから、糸球体の病変は経時的に回復傾向を示すことが示唆された。これらの所見は当初、ADA 産生及び糸球体における抗原／抗体複合体沈着と関連すると考えられた。しかし、その後の試験により腎臓の変化は sotatercept の直接的な影響によるものであり、免疫沈着のみによるものではないと考えられた[2.6.6.3.3.4 項]。

初回投与後に得られた TK パラメータを[表 2.6.6-5]に示す。全身曝露量又は C_{max} に性差は認められなかった。したがって、いずれのデータも雌雄合算値を示す。

表 2.6.6-5　皮下投与後のサル血漿中 sotatercept の平均 TK パラメータ：試験 1 日目（TT #[redacted]-7824）

Study Day	Parameter[a,b]	10 mg/kg Q2W	30 mg/kg Q2W	50 mg/kg Q2W
1	$AUC_{0\text{-}312h}$ (µg·hr/mL)	32,139	82,389	107,155
	C_{max} (µg/mL)	142	351	530

$AUC_{0\text{-}312h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 312 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; Q2W=once every two weeks; TK=toxicokinetic(s).

a Mean sexes combined data.

b Sotatercept levels at 24 hours after the first dose (anticipated C_{max}) were BLQ in 11/12 control animals.

試験2週目、4週目、8週目及び12週目に測定した投与前トラフ血漿中濃度は、投与期間を通して安定していた。2回目の投与前（試験14日目）及び最終投与前（試験84日目）に測定した一時点におけるトラフ濃度を比較したところ、両日で血漿中濃度の群平均は同程度であり、投与期間を通して十分な曝露量が維持されたことが示唆された。

ADA は試験15日目に1匹のみで検出され、この動物の曝露量への影響は認められなかった。

結論として、全用量群で有害ではない軽微な臨床病理学的検査値の変化が認められた。また、30 mg/kg Q2W 以上の用量群で腎糸球体の膜性増殖性細胞過形成（30 mg/kg Q2W 群で軽度、50 mg/kg Q2W で軽度から中等度）がみられ、50 mg/kg Q2W 群では二次的な尿細管に対する影響

を伴っていた。投与期間終了時の所見と比較して、50 mg/kg Q2W 群の回復期間後の動物における糸球体の変化の程度及び分布は改善したことから、糸球体の病変は経時的に回復傾向を示すことが示唆された。30 mg/kg Q2W 群で認められた糸球体の変化の程度が軽度であり、50 mg/kg Q2W 群では部分的な回復が認められ、関連する血液生化学的検査値に生物学的に意義のある変化がみられなかったことから、本試験の NOAEL は30 mg/kg Q2W であり、試験1日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}312h}$ はそれぞれ351 µg/mL 及び82,389 µg·hr/mL であった。

2.6.6.3.3.2 カニクイザルを用いた13週間の回復期間を伴う27週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7812）

[4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]

本 GLP 適用試験の目的は、雌雄カニクイザルに sotatercept を Q2W で27週間皮下投与したときの毒性及び TK を評価することであった[2.6.7.7.D 項]。また、本試験では13週間の回復期間を設け、投与と関連する毒性の回復性についても評価した。

カニクイザル（各群雌雄各6匹）に、PBS で調製した sotatercept を10、30若しくは50 mg/kg の用量で、又は媒体のみを Q2W で27週間皮下投与した（計14回投与）。投与容量は低用量群の0.2 mL/kg から対照群及び高用量群の1.1 mL/kg までとした。各群雌雄各3匹のサルを13週間の回復期間にわたって維持した。初回投与時にサルは3～5歳であった。

毒性の評価は、死亡、症状観察、体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、並びに臨床病理学的及び病理学的検査に基づき実施した。対照群及び sotatercept 投与群の検体を用いて、sotatercept の血清中濃度及び ADA を測定した。

本試験は当初、TT #[redacted]-7826試験（[2.6.6.3.3.3 項]参照）に代わる2ヵ月間の回復期間を伴う9ヵ月間投与試験としてデザインされた。用量は3ヵ月間投与毒性試験（TT #[redacted]-7824試験、[2.6.6.3.3.1 項]参照）のデータに基づき設定した。しかしながら、免疫複合体を介した糸球体腎炎及び腎毒性を示唆する臨床病理学的及び病理学的検査所見を伴った計画外の死亡が30 mg/kg Q2W 群の雌2匹でみられたことから、動物福祉上及び結果の解釈に対する予想される免疫原性（ADA）反応の影響を軽減するため投与期間を27週間に変更した。

被験物質と関連する計画外の死亡が2匹でみられた。30 mg/kg Q2W 群の雌2匹は、それぞれ試験142日目及び156日目に瀕死状態のため安楽殺した。安楽殺前にこれらの動物では被験物質と関連する変化として、円背位、削痩、接触時の冷感、自発運動の低下、被毛粗剛、重度の摂餌低下及び脱水、並びに BUN 及びクレアチニンの中等度からやや重度の増加（背景対照値との比較）が認められた。病理検査所見として、剖検時にみられた腎臓の黄褐色化、並びに BUN 及びクレアチニンの増加と関連する中等度から重度の尿細管間質性腎炎及び糸球体腎炎が認められた。その他の病理検査所見として、胸腺における中等度のリンパ球の枯渇が両動物で認められた。早期

死亡動物の1匹では、単核細胞浸潤を伴う軽微な限局性急性心筋壊死、限局性動脈炎を伴う膵臓の多巣性慢性炎症及び剖検時にみられた副腎の赤色化が認められた。

生存動物において、sotatercept と関連する臨床症状又は体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、凝固検査若しくは尿検査値に対する影響は認められなかった。

被験物質の薬理学的作用を介した血液学的検査値の変化として、全用量群で循環血中赤血球量を示すパラメータ（HGB、HCT 及び RBC）及び網状赤血球の軽度の増加がみられたが、これらは回復期間中に回復し、有害ではないと考えられた。対照群と sotatercept 投与群の総白血球数及びリンパ球数は同程度であった。

生存動物における被験物質と関連する血液生化学的検査値の変化は、50 mg/kg Q2W 群の雌でみられた BUN 及びクレアチニンの軽度の増加のみであり、試験152日目から試験190日目（投与期間終了時）まで持続的に認められた。回復期間中に BUN 及びクレアチニンは減少したものの、ベースラインより高い値を維持し、糸球体腎炎及び尿細管間質性腎炎を伴う雌1匹では持続的なクレアチニンの高値がみられた。

試験190日目の投与期間終了時の剖検では、被験物質と関連する組織形態学的変化が全用量群の腎臓及び胸腺に認められ、30 mg/kg Q2W 以上の用量群では脳の脈絡叢にも認められた。

腎臓の尿細管間質性腎炎が全用量群で雄より雌に多く認められ、発現頻度及び程度（軽微からやや重度）は用量依存的に増加した。尿細管間質性腎炎の所見は、全用量群で認められた腎臓の変色（蒼白色化／黄褐色化／斑状化）の剖検所見と関連し、50 mg/kg Q2W 群のみにおいては腎臓の平均重量の増加と関連した。尿細管間質性腎炎の特徴は、様々な程度（ときに顕著）の間質の線維化を伴う多巣性から癒合性の尿細管の萎縮であった。尿細管間質性腎炎が認められた個体から採取した一部の組織を用いてマッソントリクローム染色を実施したところ、間質における疎性結合組織（コラーゲン）の顕著な沈着が認められ、主に皮質尿細管に沿って糸球体及び隣接する尿細管の周囲に分布していた（対照群との比較）。関連する糸球体でときに萎縮及び硬化が認められた。主に30 mg/kg Q2W 以上の用量群で軽微から中等度の糸球体の膜性増殖性細胞過形成（糸球体腎炎）が認められ、雌で発現頻度が高かった。試験183日目における50 mg/kg Q2W 群の雌では、糸球体の膜性増殖性細胞過形成を伴う尿細管間質性腎炎の程度と、BUN 及びクレアチニンの増加の程度が、概して直接的に関連した。回復期間終了時（試験274日目）における全用量群の腎臓で、軽微からやや重度の尿細管間質性腎炎あるいは軽微な糸球体の膜性増殖性細胞過形成が依然として認められ、その発現頻度は投与期間終了時と同程度であった。投与期間終了時の所見と比較したとき、糸球体の膜性増殖性細胞過形成の程度は低下しており、部分的な回復傾向が示唆された。

投与期間終了時に50 mg/kg Q2W 群でみられた平均胸腺重量の減少は、全用量群で認められた軽微から中等度のリンパ球の枯渇と関連した。リンパ球の枯渇の発現頻度及び程度は用量依存性

ではないものの、計画外死亡動物で最も顕著であった。回復期間終了時には、このリンパ球に関する所見はいずれの用量においても認められなかった。

投与期間終了時の脈絡叢において、30 mg/kg Q2W 以上の各用量群1～2匹で軽微から軽度の泡沫状マクロファージ浸潤が認められた。回復期間中もこの変化は同様の発現頻度及び程度で認められた。

試験の TK パラメータを[表 2.6.6-6]に示す。全身曝露量又は C_{max} に性差は認められなかった。したがって、いずれのデータも雌雄合算値を示す。

表 2.6.6-6　皮下投与後のサル血清中 sotatercept の平均 TK パラメータ：試験 1 日目及び 27 週目（TT #[redacted]-7812）

Study Day/Week	Parameter[a]	10 mg/kg Q2W	30 mg/kg Q2W	50 mg/kg Q2W
Study Day 1	Predose C_{max} (µg/mL)	BLQ[b]	BLQ	BLQ
	$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg·hr/mL)	21,942	59,828	104,022
	C_{max} (µg/mL)	103	283	676
Study Week 27	Predose C_{max} (µg/mL)	67	161	223
	$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg·hr/mL)	29,336	87,589	165,039
	C_{max} (µg/mL)	187	443	1404

$AUC_{0\text{-}336h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 336 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; Q2W=once every two weeks; TK=toxicokinetic(s).

a Sotatercept levels in control samples were all BLQ (0.3 µg/mL), except for one female on Study Day 57 (0.64 µg/mL).

b Sotatercept levels for Study Day 1 predose samples were all BLQ (0.3 µg/mL) except for one female at 10 mg/kg Q2W (0.34 µg/mL).

$AUC_{0\text{-}336h}$ 及び C_{max} は、評価した用量範囲において用量比例的に増加した。Q2W で反復皮下投与したとき、循環血中に sotatercept の蓄積がみられた。試験27週目における平均蓄積比は C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}336h}$ でそれぞれ1.82及び1.46であった。

ADA は48匹中8匹、すなわち10 mg/kg Q2W 群の12匹中2匹、30 mg/kg Q2W 群の12匹中2匹、及び50 mg/kg Q2W 群の12匹中4匹で認められた。50 mg/k Q2W 群の雄1匹では、ADA による sotatercept のクリアランスの上昇に起因して、試験57日目から試験183日目（投与期間終了時）まで投与前薬物濃度が定量下限未満となった。

結論として、カニクイザルに sotatercept を27週間投与したところ、全用量群で尿細管間質性腎炎あるいは糸球体腎炎が認められ、概して発現頻度及び程度は用量依存的に増加した。これらの変化は、投与期間終了時の剖検時に50 mg/kg Q2W 群の雌で、そして試験21／23週目に中等度からやや重度の腎毒性による瀕死状態のため安楽殺した30 mg/kg Q2W 群の雌2匹で認められた BUN 及びクレアチニンの増加と関連した。13週間の回復期間後において、腎臓の組織形態学的変化の回復傾向はほとんど認められなかった。一方、BUN 及びクレアチニンは回復期間中に減少し、腎臓の部分的な機能的回復が示唆された。脈絡叢では、30 mg/kg Q2W 以上の用量群にお

いて泡沫状マクロファージ浸潤が認められ、その発現頻度及び程度は投与期間終了時及び回復期間終了時に剖検した動物で同程度であった。投与期間終了時の剖検において10 mg/kg Q2W 以上の用量群で認められたリンパ球の枯渇は、循環血中総白血球数又はリンパ球数の変化を伴わず、回復期間終了時に剖検した動物ではいずれの用量においても認められなかった。全用量群の回復期間終了時に剖検した動物で認められた腎臓の所見に基づき、本試験の NOAEL は10 mg/kg Q2W 未満であった。

2.6.6.3.3.3 カニクイザルを用いた2ヵ月間の回復期間を伴う9ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7826）

[4.2.3.2.6: TT[redacted]7826]

本試験の目的は、カニクイザルに sotatercept を0、10、30又は50 mg/kg Q2W で9ヵ月間投与したときの毒性を評価することであった。試験9週目（計4回の皮下投与後）において、対照物質及び sotatercept 投与動物の末梢血塗抹標本中にマラリア原虫が検出された頻度が異常に高く、解釈が困難となることからデータ収集を中断し、試験を中止した[2.6.7.6 項]。Sotatercept を50 mg/kg Q2W の用量で投与した1匹は、劇症マラリアによる瀕死状態のため試験5週目に安楽殺した。試験開始前に複数の動物で不顕性のマラリア原虫感染が認められたが（血液塗抹標本で確認）、これはヒト以外の霊長類におけるマラリア原虫感染の流行地域から動物を調達したことに起因したと考えられる[4.3: 084XWP]。

本試験におけるマラリア原虫感染の発現頻度及び重症度の増加が被験物質と関連するものである可能性は低い。Sotatercept を投与したいずれの試験動物種においても、感染に対する感受性を高める免疫抑制を示唆するエビデンスは得られていない。また、sotatercept を投与したいずれの試験動物種においても、末梢血白血球数又は骨髄の組織形態に対する有害な影響はみられず、また幼若ラットに KLH を投与して TDAR 検査を実施したとき、sotatercep を投与したラットは対照群と同様の IgG 応答を示した（[2.6.6.6.4.2 項]参照）。

早期マラリア原虫感染マウスモデルでは、EPO 誘発性の網状赤血球増多症及び RBC の増加により原虫の複製が加速し、死亡率が上昇する[4.3: 080S5W]。一方、IFN-α 介在性の血中寄生虫数の減少には、赤血球生成及び網状赤血球増多症の抑制が関与する[4.3: 080SJ2]。以上のデータに基づくと、赤血球成熟に対する sotatercept の僅かな影響（HCT、RBC、HGB 及び網状赤血球数の軽微で可逆的な増加）により、マラリア原虫に感染したサルの感受性が高まり顕性マラリアが発症したと考えられる。

2.6.6.3.3.4 カニクイザルを用いた3ヵ月間の回復期間を伴う9ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7938）

[4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]

本 GLP 適用試験の目的は、カニクイザルに sotatercept を9ヵ月間（Q4W で計10回又は Q2W で計20回）皮下投与したときの毒性を評価することであった。また、最短3ヵ月間の回復期間を設け、sotatercept と関連する影響の回復性についても評価した[2.6.7.7.E 項]。用量はサルを用いた27週間投与毒性試験（TT #[redacted]-7812試験、[2.6.6.3.3.2 項]参照）に基づき設定した。

カニクイザル（各群雌雄各4匹）に、媒体（PBS）又は sotatercept を1、2.6、10 mg/kg Q4W（計10回）若しくは10 mg/kg Q2W（計20回）の用量で皮下投与した。投与容量は0.2 mL/kg とした。対照群、2.6 mg/kg Q4W 群及び10 mg/kg Q4W 群、並びに10 mg/kg Q2W 群に雌雄各2匹を割り付け、3ヵ月間の回復期間にわたって維持した。初回投与時にサルは約3～5歳であった。PBS で調製した sotatercept を皮下投与用の被験物質投与液として用いた。

毒性の評価は、死亡、安全性薬理コアバッテリー評価（神経学的検査、体温、呼吸数及び血圧測定）、症状観察、体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、並びに臨床病理学的及び病理学的検査（骨髄塗抹標本検査を含む）に基づき実施した。TEM 検査により脈絡叢及び腎臓の変化を詳細に評価した。腎臓、脈絡叢、肝臓及び肺のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた IHC 検査（非 GLP 適用）を実施し、sotatercept の生体内分布、並びに糸球体及び血管の変化に対する免疫複合体沈着の関連を評価した。対照群及び sotatercept 投与群の検体を用いて sotatercept の血清中濃度及び ADA を測定した。

被験物質と関連する計画外の死亡はみられなかった。計画外の死亡は2匹（2.6 mg/kg Q4W 群の雌1匹及び10 mg/kg Q4W 群の雄1匹）でみられ、試験153日目に腸炎に起因する瀕死状態のため安楽殺した。腸炎は試験実施施設においてまれではなく、ほかの動物で用量依存的に認められた変化ではなかったため、これらの死亡は被験物質と関連しないと考えられた。

Sotatercept と関連する臨床症状、又は神経学的検査、体温、呼吸数、血圧、摂餌量、心電図、凝固検査若しくは眼科学的検査項目に対する影響は認められなかった。

10 mg/kg Q2W 群の雌雄において被験物質と関連する体重増加量の減少が認められ、試験40週目の体重は対照群と比較して雌で8%、雄で18%減少した。回復期間終了時には、被験物質投与群の体重は対照群と同程度又はそれ以上であった。

被験物質の薬理学的作用を介した血液学的検査値の変化として、循環血中赤血球量を示すパラメータの軽度な変化（HGB、HCT、RBC、RDW の増加及び MCV、MCH の減少）及び網状赤血球の軽度の増加がみられ、概して全用量群で同程度であり、投与期間を通して程度の増加は認められなかった。循環血中赤血球量の増加は、10 mg/kg Q2W 群における骨髄内の骨髄球系／赤芽球系細胞比の軽微な低下と関連した。10 mg/kg Q2W 群の雄でのみ、血小板数の軽微な減少が認められた。また、全用量群の一部の動物において、軽度で散発的、かつ非用量依存的な単球数の増加が認められた。いずれの血液学的検査値の変化も有害ではなく、回復期間終了時までに回復性が示された。

被験物質と関連する血液生化学的検査値の変化として、2.6 mg/kg Q4W 以上の雌雄で BUN 及びクレアチニンの軽微から軽度の増加が認められた。これらの変化は試験85日目に認められ、概して試験280日目まで用量依存的に進行し、また腎臓の病理組織学的所見と関連したことから、2.6 mg/kg Q4W 以上の用量で有害であると考えられた。血液生化学的検査値の変化はいずれも3ヵ月間の回復期間終了時までに回復した。

被験物質と関連する尿検査値の変化として、2.6 mg/kg Q4W 以上の雌雄で尿蛋白の、10 mg/kg Q4W 以上の雌雄で尿潜血の軽微な増加が認められた。これらの変化は概して試験280日目から認められ、回復期間終了時までに回復した。

被験物質と関連する病理検査所見は、主に投与期間終了時の剖検で腎臓、脈絡叢、脾臓及び肝臓に認められた。皮下投与部位における sotatercept 投与液の忍容性は良好であった。10 mg/kg Q4W 以上の雌雄において、軽微から軽度の膜性増殖性糸球体症（10 mg/kg Q4W 群と比較して10 mg/kg Q2W 群における膜性増殖性糸球体症の発現頻度及び程度はより増加した）、線維化を伴う軽微から軽度の間質の炎症、皮髄境界部の軽微な基質沈着の増加、あるいは小型の糸球体係蹄の発現頻度増加が認められ、これらと関連して10 mg/kg Q2W 群の雄で腎臓重量の増加、10 mg/kg Q4W 以上の用量群で腎臓の剖検所見（肥大、変色、あるいは皮質表面の不整）が認められた。2.6 mg/kg Q4W 群における腎臓の変化は、雄1匹に認められた線維化を伴う軽微な間質の炎症及び雌雄に認められた小型の糸球体係蹄の発現頻度増加のみであった。1 mg/kg Q4W 群における腎臓の変化は、雌2匹で認められた皮髄境界部の軽微な基質沈着の増加のみであり、有害ではなかった。10 mg/kg Q2W 群の一部の動物の腎臓を用いて IHC 検査を実施したところ、糸球体及び尿細管の形態学的変化は、sotatercept に対する免疫応答と一致する変化である IgG、IgM あるいは C3の沈着と共局在していた。TEM 検査を実施した腎切片において、典型的な免疫複合体沈着は認められなかった。しかし、メサンギウム細胞及びその周囲に過剰なタンパク質沈着が認められ、これは IHC 検査でみられたカニクイザルの IgM 及び IgG の沈着と関連する可能性がある。複数の抗原回収・増幅法を用いても sotatercept の蓄積（ヒト IgG Fc 部分あるいは ActRIIA 部分）を確認することはできず、腎臓における sotatercept 及び宿主抗体の共局在に関する結論は得られなかった。

脈絡叢では、被験物質と関連する変化として単核細胞（リンパ球及び形質細胞）及び泡沫状マクロファージ浸潤が認められた。1 mg/kg Q4W 以上の大部分の動物において、脈絡叢に軽微から軽度の単核炎症性細胞の小型の限局性凝集体が認められた。同程度の単核細胞浸潤はときに背景変化として認められるものであり、ほかの sotatercept と関連する変化を伴わないことから、有害ではないと考えられた。2.6 mg/kg Q4W 群及び10 mg/kg Q4W 群において、軽微から軽度の泡沫状マクロファージの血管周囲への蓄積が低頻度（各群1～2匹）で認められた。10 mg/kg Q2W 群では、この変化の発現頻度（8匹中6匹）及び程度（軽微から中等度）は増加した。泡沫状マクロファージの蓄積は、主に10 mg/kg Q2W 群における小動脈及び細動脈の軽微な内膜肥厚と関連した。10 mg/kg Q2W 群の一部の動物の脈絡叢を用いた IHC 検査を実施したところ、泡沫状マクロファ

ージ及び血管の変化は、sotatercept に対する免疫応答と一致するサル IgG、IgM あるいは C3の沈着と関連することが確認された。腎臓と同様に、TEM 検査では血管周囲に過剰なタンパク質性物質が認められ、これは IHC 検査で確認された宿主抗体沈着を示唆している可能性がある。複数の抗原回収・増幅法を用いても sotatercept の蓄積を確認することはできず、脈絡叢における sotatercept 及び宿主抗体の共局在に関する結論は得られなかった。関連する臨床症状はみられず、脈絡叢の変化は全用量群において可逆的であったことから、これらの変化は有害ではないと考えられた。10 mg/kg Q2W 群の一部の動物の肝臓及び肺組織を用いて IHC 検査を実施したところ、免疫複合体は検出されなかった。

10 mg/kg Q4W 以上の用量群における被験物質と関連する脾臓重量の減少は、2.6 mg/kg Q4W 以上の用量群でみられた脾臓の濾胞胚中心の大きさ及び数の軽度から中等度の減少（リンパ球の枯渇）と関連した。その他のリンパ系組織では被験物質と関連する影響は認められなかった。

被験物質と関連する肝臓における軽微な単核細胞浸潤の発現頻度の増加が、全用量群で認められた。1 mg/kg Q4W 群で認められたこの変化の発現頻度は、試験実施施設において無処置のサルの肝臓にときにみられるものと同様であり、有害ではないと考えられた。

各 sotatercept 用量群の1～2匹の心臓、大動脈あるいは膵臓において、軽微から軽度の血管周囲又は血管の好塩基性の沈着物が散発的に認められた。この所見は程度が低く、これらの組織と関連する有害な変化が認められなかったことから、有害ではないと考えられた。

3ヵ月間の回復期間終了時には、10 mg/kg Q4W 以下の用量群における被験物質と関連する変化はいずれも回復した。10 mg/kg Q2W 群では、回復期間終了時に被験物質と関連する所見として、腎臓における線維化を伴う軽微な間質の炎症のみが認められ、雄1匹で認められた皮質被膜表面の不整及び腎皮質の赤色化の剖検所見と関連していた。2.6 mg/kg Q4W 群及び10 mg/kg Q2W 群では、小型の糸球体係蹄の軽微な発現頻度増加が認められた。10 mg/kg Q4W 以上の用量群では膜性増殖性糸球体症は認められなかったことから、腎臓の変化は部分的に回復したことが示唆された。小型の糸球体係蹄は一部のサルで背景所見として認められることから、この変化は有害ではないと考えられた。

試験の TK パラメータを[表 2.6.6-7]に示す。全身曝露量又は C_{max} に性差は認められなかった。したがって、いずれのデータも雌雄合算値を示す。

表 2.6.6-7　皮下投与後のサル血清中 sotatercept の平均 TK パラメータ：試験 1 日目、17 週目及び 37／39 週目（TT #[redacted]-7938）

Study Day/Week	Parameter[a,b]	1 mg/kg Q4W	2.6 mg/kg Q4W	10 mg/kg Q4W	10 mg/kg Q2W
Study Day 1	Predose C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	$AUC_{0\text{-last}}$ (µg·hr/mL)	3945	12,188	26,116	22,617
	C_{max} (µg/mL)	11.4	40.8	85.6	104.9
	T_{max} (hr)	47.7	57.1	48.7	51.2
Study Week 17	Predose C_{max} (µg/mL)	1.6	3.3	8.2	47.8
	$AUC_{0\text{-last}}$ (µg·hr/mL)	3365	8441	28,724	32,019
	C_{max} (µg/mL)	10.1	30.1	119.0	162.6
	T_{max} (hr)	75.0	62.0	46.0	50.0
Study Week 37/39[c]	Predose C_{max} (µg/mL)	2.6	3.1	8.3	43.8
	$AUC_{0\text{-last}}$ (µg·hr/mL)	6030	11,729	30,776	34,555
	C_{max} (µg/mL)	21.4	51.2	126.7	164.4
	T_{max} (hr)	81.0	52.9	48.0	48.0

$AUC_{0\text{-last}}$=area under the concentration-time curve from time 0 to time with last quantifiable concentration; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; hr=hour(s); Q2W=once every two weeks; Q4W=once every four weeks; TK=toxicokinetic(s); T_{max}=time to reach maximum concentration.

a Sotatercept levels in control samples were all BLQ (0.3 µg/mL).

b $AUC_{0\text{-last}}$ is 0 to 672 hours for the 1, 2.6, and 10 mg/kg Q4W dose groups and 0 to 336 hours for the 10 mg/kg Q2W dose group.

c Week 37 for Q4W groups; Week 39 for Q2W group.

単回及び反復投与後の AUC 及び C_{max} は用量比例的に増加した。反復投与後には血清中に sotatercept の蓄積がみられた。試験37週目における Q4W 投与の平均蓄積比は C_{max} 及び $AUC_{0\text{-672h}}$ でそれぞれ1.55及び1.19であった。試験39週目における Q2W 投与の平均蓄積比は C_{max} 及び $AUC_{0\text{-336h}}$ でそれぞれ1.66及び1.60であった。

10 mg/kg Q4W 群の雌1匹が ADA 陽性であったが、この動物の sotatercept のクリアランスに対する ADA の影響は認められなかった。より高感度の免疫原性（ADA）アッセイを用いて同じ検体を再分析したところ、ADA 陽性の動物は確認されなかった。

結論として、カニクイザルに sotatercept を9ヵ月間投与したとき、全用量群で被験物質と関連する所見が認められた。2.6 mg/kg Q4W 以上の用量群において投与期間中に認められた被験物質と関連する有害な所見として、腎障害を示唆する血液生化学的検査値の変化、腎臓の線維化を伴う間質の炎症及び小型の糸球体係蹄の発現頻度増加、並びに脾臓のリンパ球の枯渇がみられた。10 mg/kg Q4W 以上の用量群における腎臓の有害な組織形態学的変化として、膜性増殖性糸球体症、線維化を伴う間質の炎症、皮髄境界部の基質沈着の増加あるいは小型の糸球体係蹄の発現頻度増加が認められた。3ヵ月間の回復期間終了時には、10 mg/kg Q2W 群の雄1匹で腎臓の間質の炎症及び線維化を伴う有害な所見が認められた。10 mg/kg Q4W 以上の用量群では膜性増殖性糸

球体症が認められなかったことから、腎臓の変化は部分的に回復したことが示唆された。2.6 mg/kg Q4W 群及び10 mg/kg Q2W 群において、小型の糸球体係蹄の軽度の発現頻度増加がみられたものの、小型の糸球体係蹄は対照群のサルにおいても背景所見としてみられることがあり、有害ではないと考えられた。その他の被験物質と関連する所見は、3ヵ月間の回復期間終了時にいずれも回復した。

1 mg/kg Q4W 群で認められた所見はいずれも軽微／軽度であり、発現頻度が低く可逆的であったことから、本試験の NOAEL は1 mg/kg Q4W（$AUC_{0\text{-}672h}$は6,030 µg·hr/mL）であった。

2.6.6.3.4 サル静脈内投与

2.6.6.3.4.1 雌雄カニクイザルを用いた週1回の4回静脈内投与による毒性及びトキシコキネティクス試験（TT #[redacted]-7847）

[4.2.3.2.8: TT[redacted]7847]

本 GLP 適用試験の目的は、雌雄カニクイザルに sotatercept を Q1W で4回静脈内投与したときの毒性及び TK を評価することであった[2.6.7.6 項]。

カニクイザル（各群雌雄各5匹）に媒体（PBS）又は sotatercept を1、10若しくは30 mg/kg Q1W で4週間静脈内投与した（計4回投与）。投与容量は3 mL/kg とした。動物の末梢血管から1分間かけて静脈内投与した。各群雌雄各2匹のサルを4週間の回復期間にわたって維持した。初回投与時にサルは3～4歳であった。PBS で調製した sotatercept を静脈内投与用の被験物質投与液として用いた。

毒性の評価は、死亡、症状観察（呼吸数、心拍数、直腸温及び毛細血管再充満時間の評価を含む）、体重、摂餌量、心電図、眼科学的検査、臨床病理学的検査及び病理学的検査（骨髄塗抹標本及び雄生殖能の評価を含む）に基づき実施した。Sotatercept 投与動物の検体を用いて、sotatercept の血漿中濃度及び ADA を測定した。

計画外の死亡又は被験物質と関連する臨床症状はみられず、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図（波形の定性的評価）、凝固検査、尿検査又は病理学的検査（剖検、器官重量、組織学的検査）のパラメータに変化は認められなかった。投与部位における sotatercept 投与液の忍容性は良好であった。

被験物質の薬理学的作用を介した血液学的検査値の変化として、全用量群で投与期間及び回復期間中における循環血中赤血球量を示すパラメータ（HGB、HCT 及び RBC）及び網状赤血球の軽度の増加が認められた。循環赤血球量の増加は、10 mg/kg Q1W 以上の用量群で試験57日目に認められた骨髄内の骨髄球系／赤芽球系細胞比の軽度の低下と関連した。

全用量群の雄で試験15日目及び29日目に平均 ALP の増加が認められ、試験57日目にもより低い程度で認められたが、関連する病理組織学的所見はみられず、ほかの sotatercept のサルを用いた試験においても認められなかったことから、被験物質と関連する変化ではないと考えられた。

動物が若齢（3～4歳）であり性成熟していなかったため、精巣上体の精子数は低値を示すかあるいは全く認められず、全用量群でデータは大きく変動した。したがって、精巣上体の精子数及び精子の形態に対する sotatercept の有害な影響を評価することはできなかった。

初回投与後、試験8日目、15日目及び22日目の投与前、並びに各動物の剖検の前に、sotatercept の血漿中濃度を測定した。一部のデータを[表 2.6.6-8]に示す。

表 2.6.6-8　静脈内投与後のサルの平均（±SD）血漿中 sotatercept 濃度：試験 29 日目及び 57 日目）（TT #[redacted]-7847）

Dosage (mg/kg Q1W)	C_{max}[a] (µg/mL)	Study Day 29 Plasma Concentration (µg/mL) (672 hr)[b]	Study Day 57 Plasma Concentration (µg/mL) (1344 hr)[c]
1	38.7 ± 20.5	71.2 ± 21.0	30.4 ± 11.9
10	323.1 ± 99.4	503.2 ± 148.2	239.0 ± 162.7
30	1682.5 ± 1653.2	1555.6 ± 753.1	776.8 ± 580.3

C_{max}=observed maximum concentration; hr=hour(s); Q1W=once weekly; SD=standard deviation.

a C_{max} following the first dose (0.25 hr, Study Day 1).

b Measured on the day of necropsy (end of the dosing period).

c Measured on the day of necropsy (end of the treatment-free period).

1 mg/kg Q1W 群、10 mg/kg Q1W 群及び30 mg/kg Q1W 群において、ADA は試験29日目にそれぞれ10匹中0匹、10匹中1匹及び10匹中1匹で、試験57日目にそれぞれ4匹中0匹、4匹中2匹及び4匹中1匹で検出された。高濃度の sotatercept は血清中 ADA の検出を妨害する可能性があることから、抗 sotatercept 抗体の真の発現率は不明である。Sotatercept の血漿中濃度に対する ADA の影響はないと考えられた。

結論として、カニクイザルに sotatercept を最高30 mg/kg Q1W の用量で4週間静脈内投与したときの忍容性は概して良好であった。被験物質と関連する変化は、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で認められた有害ではない、薬理学的作用を介した赤血球パラメータに対する影響のみであり、10 mg/kg Q1W 以上の用量群でみられた骨髄球系／赤芽球系細胞比の低下と関連した。これらの所見に基づき、静脈内投与後の NOAEL は30 mg/kg Q1W 以上であった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

ICH S6（R1）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」によると、バイオテクノロジー応用医薬品に関する遺伝毒性試験は必要とされないため、sotatercept の遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.6.5 がん原性試験

げっ歯類への長期投与時には、ADA が曝露量に悪影響を及ぼす可能性があること、また腎毒性による動物の生存率の低下が懸念されることから、sotatercept のがん原性試験は実施しなかった。ラットを用いた短期投与試験（TT #[redacted]-7833）において、sotatercept の平均曝露量は試験期間を通して維持された。しかし、3ヵ月間の投与期間終了時までに ADA 発現率は最大65%に達し、多くの動物で sotatercept 濃度は定量下限を下回った。3ヵ月間投与 TK 試験と同様の投与期間で実施した雄受胎能試験（TT #[redacted]-7840）では、ADA の総発現率は57.3%であった。より長期間の投与ではげっ歯類における ADA 発現率はさらに上昇し、sotatercept の曝露量及びげっ歯類を用いた長期投与試験で得られた結果の解釈に悪影響を及ぼすと予想される。また、ラットを用いた3ヵ月間投与試験（TT #[redacted]-7833）において、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で sotatercept に起因した腎毒性（膜性増殖性糸球体腎炎）が認められ、30 mg/kg Q1W 群では尿中の腎障害バイオマーカーの増加を伴った。なお、この影響はこれまでに臨床試験では確認されていない。腎毒性の進行により、特に高齢ラットに好発する慢性進行性腎症の発現と関連して、動物の生存率及びラットを用いた長期投与試験の実現可能性が低下すると予想される。したがって、ICH S6（R1）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」に従い、sotatercept のがん原性については WOE に基づくリスク評価を実施した（がん原性試験の免除申請[4.3: 086F6B]）。WOE に基づくリスク評価及びがん原性試験の免除申請に関する文書は、米国食品医薬品局（FDA）の発がん性評価委員会に提出済みである［[redacted]へのがん原性試験免除申請は20[redacted]年[redacted]月[redacted]日に提出（[redacted]）］。当委員会は、sotatercept に関してがん原性試験は必要とされないことを了承した。同様に、欧州医薬品庁（EMA）はがん原性試験が必要とされないことに非公式に同意した。

WOE に基づくリスク評価において提示した主な考察を以下に要約する。

Sotatercept は TGF-β スーパーファミリーに属する増殖促進サイトカインを阻害する生物学的製剤である。Sotatercept の主要なリガンドはアクチビン A/B、GDF-11、GDF-8及び BMP-10である。これらのリガンドは重複する一連の受容体を介してシグナルを伝達し、同じ一連の Smad タンパク質と共役する。このような重複があるものの、リガンド及び受容体の異なる時空間的発現パターン及びシグナル伝達動態、並びに異なる段階で反応を調節する調節性タンパク質の存在により、TGF-β スーパーファミリーの因子間の機能的な重複は制限されている[4.3: 084XW6]。

肺高血圧症の動物モデルにおいて、sotatercept は血管平滑筋細胞に対して増殖抑制作用を示す。包括的な非臨床毒性試験プログラムの一環として検討したいずれの動物種においても、健康な正常動物では sotatercept の投与による増殖性又は前腫瘍性の変化は認められなかった。また、sotatercept は生物学的製剤であるため、遺伝毒性のリスクを伴わない。

アクチビンは主に下垂体からの FSH 放出を刺激することで、ホルモンのシグナル伝達を調節する。FSH のシグナル伝達あるいは血漿中濃度の増加は、乳癌及び卵巣上皮癌の発現頻度増加に

関連する。そのため、sotatercept と関連する FSH の減少がこれらのがん種に対して有益となる可能性がある。ホルモン調節における GDF-11、GDF-8及び BMP-10の関与は報告されていない。Sotatercept を投与した雌雄ラットにおいて、生殖器の構造あるいは機能に認められた変化はアクチビン阻害によるものであり、ホルモン調節によるものではないと考えられる。雄ラットの精巣及び精巣上体で認められた変化並びに雄受胎能に対する影響は、精巣輸出管レベルでの流出路閉塞による二次的なものと考えられ、性ホルモンに対する潜在的な直接的影響とは一致しなかった。雌ラットにおける着床前及び着床後胚損失率の上昇は、作用機序に基づくアクチビンの減少に起因すると考えられる。アクチビンは、着床のための子宮内膜の脱落膜化及びプライミングに重要である[4.3: 080SJ7]。Sotatercept の幼若ラットを用いた試験で認められた LH、FSH あるいはエストラジオールのごく軽微な変化は、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。また、個々の動物における EPO 濃度の増加は軽微であり、投与との関連は不明であった。非臨床試験で用いたサルは性成熟していなかったが、sotatercept を最長9ヵ月間投与したとき、投与と関連する雌雄生殖器の変化は認められなかった。以上より、科学文献及び非臨床データは、作用機序に基づく sotatercept のリガンドの減少が、発がん促進的にホルモンシグナル伝達に影響を及ぼす可能性は低いということを示唆している。

アクチビン A は免疫応答の調節に関与しており、重要な炎症性及び免疫調節性サイトカインとして知られている。アクチビン A 及びそのアンタゴニストであるフォリスタチンは全身性の炎症に応じて増加し、免疫細胞の多くはアクチビン A の産生能及び応答能を有する。その応答は細胞型間で異なり、細胞の成熟度及び活性化状態、並びに免疫応答の空間的及び時間的背景に応じて異なる。アクチビン A は、マクロファージにおいてその活性化状態に応じて炎症促進性又は抗炎症性反応のいずれかを調節する。また文献データでは、アクチビン A が B 細胞による抗体産生を刺激し、制御性 T 細胞の発生にも影響することが示唆されている[4.3: 084XXC]。一方、GDF-8 及び GDF-11が免疫機能に及ぼす潜在的な影響については十分に報告されていない。アクチビンのシグナル伝達が免疫機能の調節に関与している可能性はあるものの、sotatercept が免疫機能に影響するという明確なエビデンスはない。Sotatercept のサルを用いた試験の1つ（TT #[redacted]-7826）では、多くの動物でマラリア原虫感染が認められ、かつ1匹は劇症マラリアのため早期に安楽殺したことから、試験を早期に中止した。マラリア原虫は試験開始前に存在していたが、9週間の投与期間を通してその発現頻度及び重症度は増加した。Sotatercept を介した免疫機能の変化がこれらの動物の感受性を高めた可能性はあるものの、赤血球生成促進剤により潜在的な宿主細胞集団が増加し、マラリア原虫感染が亢進する可能性があることは広く認識されている[4.3: 084XWP]。そのため、sotatercept を介した免疫機能の変化ではなく、sotatercept を介した赤血球及び網状赤血球の増加によりマラリア原虫に対する試験動物の感受性が高まったと考えられる。完了した sotatercept の非臨床試験のうち、サルを用いた27週間投与試験（TT #[redacted]-7812）の10 mg/kg Q2W 以上の用量群の胸腺に、及び9ヵ月間投与試験（TT #[redacted]-7938）の2.6 mg/kg Q4W 以上の用量群の脾臓において、軽微から中等度のリンパ球の枯渇が認められた。一方で、評価した全用量群のサル及び成熟ラットにおいて、胸腺又は脾臓の変性又は壊死を示す所見、その他のリンパ組織にお

ける有害な所見及び循環血中白血球の意味のある変化はみられなかった。幼若ラットで認められたリンパ系の変化は、概して脾臓の白脾髄辺縁帯における軽微から軽度の細胞充実性の低下、あるいは赤脾髄における軽微から軽度の細胞充実性の増加のみであった。幼若ラットを用いた重要な試験では、TDAR アッセイにおいて sotatercept と関連する変化は認められず、イムノフェノタイピングデータから免疫抑制は示唆されなかった。非臨床試験のデータを総じて、sotatercept には毒性学的に意味のある免疫調節作用はなく、がん原性に影響を及ぼさないことが示唆される。

Sotatercept のリガンド及びその様々な細胞内シグナル伝達経路の役割に関して、腫瘍生物学との関連性については科学文献の多くで結論が出ていない。アクチビン A 及び GDF-11は、一定の条件下ではアポトーシス又は増殖抑制を誘導し、それ以外では増殖を促進することが示されている[4.3: 084XWJ]。また、アクチビン A と構造的に類似し、シグナル伝達経路の重要な部分が共通している TGF-β は、がん原性において二重の役割を持つとされている[4.3: 084XW6]。Sotatercept は多面的なリガンド結合プロファイルを持つこと、また複数の科学的文献の結論が一貫していないことを考慮すると、このデコイ受容体が腫瘍増殖に対して負又は正の影響を及ぼす可能性について意味のある結論を導き出すことは困難である。同様に、腫瘍免疫学におけるアクチビン A の作用は、細胞型／腫瘍本体及び免疫応答の状況に応じて異なるため、予測が困難である[4.3: 084XW6]。Sotatercept のリガンドの受容体（ACVR2A、ACVR2B、ALK1、ALK4、ALK5及びALK7）とヒト腫瘍との関連性を、ヒト遺伝学データベース［Online Mendelian Inheritance in Man（www.omim.org）、the Open Targets Genetics portal（https://genetics.opentargets.org）］、ヒトがん遺伝子データベース［Catalogue of Somatic Mutations In Cancer（https://cancer.sanger.ac.uk）、及び Intogen（https://www.intogen.org）］を用いて評価した。データベースの検索は20[redacted]年[redacted]月から[redacted]月に実施した。その結果、これらの受容体と潜在的なヒトがん原性リスクとの直接的な関連性は確認されなかった。

以上より、sotatercept の非臨床プロファイル及び文献情報は、この生物学的分子が遺伝毒性を示さず、PAH の動物モデルにおいて増殖及び線維化抑制作用を示し、ホルモンに悪影響を及ぼさず、動物で免疫毒性、過形成又は腫瘍発生を引き起こさないこと、また sotatercept のリガンドの結合に係わる受容体がヒトにおけるがん原性と直接的に関連しないことを示している。この WOE に基づき、sotatercept のがん原性リスクは低いと考える。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

2.6.6.6.1.1 Sprague Dawley ラットを用いた13週間の回復期間を伴う週1回皮下投与による GLP 適用の雄受胎能に関する試験（TT #[redacted]-7840）

[4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]

本 GLP 適用試験の目的は、雄 Crl:CD（SD）ラットに同居前から無処置雌ラットとの交配期間中及び安楽殺時点まで sotatercept を Q1W で投与したときの雄受胎能に対する影響を評価するこ

とであった[2.6.7.12.A 項]。投与期間中に認められた影響の回復性を評価するため、約13週間の回復期間を設けた。本試験は ICH ガイドラインの生殖発生ステージ A 及び B を評価するようにデザインされており、雌における卵管内輸送、着床及び着床前段階の胚発生に対する影響を検出し、病理組織学的検査では検出されない雄性生殖器への機能的な影響（交尾行動又は精巣上体内の精子成熟に対する影響など）の検出を可能とするものである。本試験では雄にのみ投与した。

各群30匹の雄ラットに、媒体（[redacted]）又は sotatercept を0.3、3若しくは30 mg/kg の用量で、同居前、同居期間中に Q1W で10週間皮下投与し、同居後も継続して Q1W で3週間皮下投与した（計13回投与）。投与容量はいずれの群も 1 mL/kg とした。各群最大15匹の雄を13週間の回復期間にわたって維持した。投与開始時に雄は約10週齢であった。媒体で調製した sotatercept を皮下投与用の被験物質投与液として用いた。各群最少45匹の無処置雌ラットを4群に無作為に割り付け、投与した雄動物と交配させた。本試験では雌ラットには媒体又は sotatercept を投与しなかった。全てのラットで、生存性、症状観察、体重、体重増加量、摂餌量、交尾能及び受胎能、並びに剖検所見を評価した。さらに雄ラットでは精子運動能、精子濃度及び生殖器重量の評価、並びに生殖器の病理組織学的検査を実施し、無処置雌ラットでは性周期、並びに卵巣及び子宮内容物を評価した。雄ラットにおける sotatercept の曝露量は TT #[redacted]-7833試験[2.6.6.3.1.2 項]から得られた0.3、3及び30 mg/kg Q1W の用量での TK データに基づき推定した。対照群及び sotatercept 投与群の雄で sotatercept に対する ADA 反応を評価した。

Sotatercept と関連する計画外の死亡はなかった。計画外の死亡は3匹でみられ、対照群の雄1匹は試験64日目に死亡が確認され、30 mg/kg Q1W 群の雄1匹は回復期間中（試験148日目）に死亡が確認されたが、他の毒性徴候は認められなかった。また、30 mg/kg Q1W 群の雄1匹は、投与と関連しないと考えられる有害な臨床症状が認められたため試験36日目に安楽殺した。

被験物質と関連する臨床症状又は摂餌量に対する影響は認められなかった。

被験物質と関連する体重変化は、全用量群で認められた試験1日目から8日目における平均体重増加量の一過性の減少（0.3 mg/kg Q1W 群、3 mg/kg Q1W 群及び30 mg/kg Q1W 群でそれぞれ-12%、-14%及び-18%）のみであった。

投与期間終了時に、対照群と比較して30 mg/kg Q1W 群の受胎率及び妊孕率が低下した（対照群の96.6%に対して82.8%）。回復期間終了時には、被験物質と関連する受胎能又は交尾能に対する影響はいずれの用量においても認められなかった。

被験物質と関連する剖検所見は精巣及び精巣上体にのみ認められ、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群において投与期間終了時及び回復期間終了時の剖検で片側性又は両側性の小型化又は異常な硬化がみられた。これらの変化は精巣の変性／萎縮又は精巣上体管腔内の精子密度の減少と関連した。

投与期間又は回復期間のいずれの時点においても、sotatercept と関連する器官重量の変化は認められなかった。

投与期間終了時の剖検では、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群の精巣輸出管でみられた様々な病理組織学的所見の発現頻度及び程度は用量依存的に増加し、軽微からやや重度の精子肉芽腫、軽微から軽度の精子うっ滞、軽微な線維化、軽微から軽度の鉱質沈着、あるいは軽微から軽度の混合性細胞浸潤が認められた。これらの変化の多くは片側性（ときに両側性）であり、精巣輸出管における限局性の鉱質沈着あるいは線維化といった小さな病巣から、精子うっ滞及び周囲の混合性細胞浸潤といった広範囲のものまでみられた。一部の動物では精子肉芽腫が認められ、精巣輸出管の閉塞を伴った。0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群の精細管における変化として、片側性又は両側性の変性／萎縮の発現頻度及び程度の増加が認められ、概して精巣輸出管の変化と関連した。30 mg/kg Q1W 群の一部のラットでは、その他の変化として軽度の精細管拡張、精巣網の拡張／精子うっ滞あるいは精子肉芽腫が認められた。これらの動物では、中等度から重度の片側性又は両側性の精巣上体の細胞充実性の低下（管腔内の精子減少）も認められた。精巣及び精巣上体に対する影響は、精巣輸出管レベルでの流出路閉塞による二次的なものと考えられた。

回復期間終了時の剖検では、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で精巣輸出管における病理組織学的変化として、軽度の精子肉芽腫、軽微な精子うっ滞、軽微な線維化、軽微な鉱質沈着あるいは軽微から軽度の混合性細胞浸潤が認められた。これらの変化の多くは片側性（ときに両側性）であり、精巣輸出管における限局性の鉱質沈着あるいは線維化といった小さな病巣から、精子うっ滞及び周囲の混合性細胞浸潤又は完全に形成された精子肉芽腫といった広範囲のものまでみられた。一部の動物では、精巣上体に隣接する脂肪内の混合性炎症細胞浸潤も認められた。これらの変化は用量依存的であり、投与期間終了時の剖検で認められた変化と概して類似した。精巣輸出管に対する影響に関連して、ラットではときに精細管拡張を伴う／伴わない片側性又は両側性の精細管の変性／萎縮、精子肉芽腫、精子うっ滞、あるいは鉱質沈着及び精巣上体の精子密度の減少が認められた。回復期間終了時の剖検では、対照群と比較して発現頻度の顕著な増加は認められなかった（対照群のラット1匹で精巣及び精巣上体に同様の片側性の変化がみられたため）。投与期間終了時及び回復期間期間終了時の両剖検において、精巣及び精巣上体に対する二次的な影響を伴う精巣輸出管の変化が高頻度で認められたことから、全用量群で雄性生殖器に認められた変化は sotatercept と関連するものであり、有害であると考えられた。

本試験の精巣輸出管及び3ヵ月間投与毒性試験（TT #[redacted]-7823）の精巣で認められた病理組織学的特性と、これらの変化の発現頻度が低いこと、またこれらの影響が主に片側性であったことは、いずれも精巣輸出管の閉塞の結果生じる体液動態の変化に一致する[4.3: 085GRJ][4.3: 085GSF][4.3: 043WCW][4.3: 085GRV][4.3: 085MQ9]。一方で、精巣に対する直接的な毒性作用は概して両側性にみられると考えられる。

精子の生存性の維持及び精子の管腔内への輸送には、精巣のセルトリ細胞における体液分泌が必要である[4.3: 043WCW]。また、ラットでは精巣網中の体液の約90%は精巣輸出管で再吸収さ

れる[4.3: 085GRL]。Sotatercept を投与したラットの雄性生殖器で認められた影響は、精巣輸出管の閉塞あるいは体液の再吸収の阻害、精巣の精細管内腔における有害な背圧上昇、及び圧力変化に関連する二次的な精巣の萎縮と一致している[4.3: 085GRV][4.3: 085GS4][4.3: 085GS8][4.3: 085MQ9]。

ラットとヒトでは精巣輸出管の構造に解剖学的な相違があるため、ヒトでは精巣輸出管の閉塞による精巣毒性のリスクは低い。ラットの精巣輸出管は長く、精巣上体に入る単一の管に吻合する[4.3: 085GRJ][4.3: 085GSC]が、ヒトの精巣輸出管ははるかに短く、単一の管に吻合することはなく複数の管により精巣上体に入る[4.3: 085GRV][4.3: 085GS3]。このためヒトでは、複数の精巣輸出管の閉塞又は体液の再吸収の阻害にかかわらず体液の流出が生じる。

30 mg/kg Q1W 群では、投与期間終了時に精巣上体尾部における精子密度が対照群と比較して減少した（対照群に対して-27%）。回復期間終了時には、いずれの用量群においても sotatercept と関連する精子パラメータ（精管における精子運動性、精巣上体尾部における精子密度）の変化は認められなかった。

要約すると、既存のデータ及び文献情報から、ラットで認められた精巣毒性は精巣輸出管の閉塞による二次的な体液動態の変化に起因することが強く示唆される。ラットとヒトでは精巣輸出管の構造に解剖学的な相違があるため、同様の精巣に対する影響がヒトで認められる可能性は低いと考えられる。

投与した雄と交配させた無処置の雌における卵巣又は子宮パラメータには、被験物質と関連する影響は認められなかった。

ADA は、対照群の30匹中0匹、0.3 mg/kg Q1W 群の30匹中16匹（53.3%）、3 mg/kg Q1W 群の30匹中17匹（56.7%）、30 mg/kg Q1W 群の29匹中18匹（62.1%）で認められ、総発現率は57.3%（89匹中51匹）であった。

結論として、雄 Sprague-Dawley ラットに sotatercept を0.3、3又は30 mg/kg の用量で、同居前から同居期間中を通して安楽殺の前日まで10週間にわたり Q1W で皮下投与したとき、被験物質と関連する変化が全用量群で認められた。全用量群で投与期間の初期に一過性の体重増加量の減少が認められたが、有害ではないと考えられた。30 mg/kg Q1W 群では、投与期間終了時に精巣上体尾部の精子密度の減少、並びに受胎率及び妊孕率の低下が認められたが、回復期間終了時には認められなかった。投与期間終了時及び回復期間終了時に、全用量群において用量反応性の病理組織学的所見が精巣輸出管に認められ、精巣及び精巣上体に対する二次的な影響を伴ったことから有害であると考えられた（精巣輸出管／精巣の変化に対する NOAEL は0.3 mg/kg Q1W 未満）。

3 mg/kg Q1W 以下の用量群では、精巣輸出管及び精巣の所見に随伴する生殖機能障害は認められなかった。よって、30 mg/kg Q1W 群で認められた生殖機能所見のみが有害であると考えられた。したがって、生殖に対する NOAEL は3 mg/kg Q1W であり、そのときの C_{max} は20.3 µg/mL、$AUC_{0\text{-}168h}$ は2,960 µg·hr/mL と推定される。

2.6.6.6.1.2 雌ラットを用いた皮下投与による受胎能及び初期胚発生に関する試験（TT #[redacted]-7863）

[4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]

本 GLP 適用試験の目的は、sotatercept を Q1W で皮下投与したときの雌受胎能（雌の性周期、卵管内輸送、着床及び着床前段階の胚発生の評価を含む）に対する影響を評価することであった[2.6.7.12.B 項]。本試験では雌にのみ投与した。

各群25匹の雌 Sprague-Dawley ラットに、媒体（PBS）又は sotatercept を5、15若しくは50 mg/kg の用量で、交配及び同居の2週間前から妊娠7日目まで Q1W で皮下投与した（最大計5回投与）。投与容量はいずれの群も1 mL/kg とした。また、各群3匹（対照群）から5匹（sotatercept 投与群）の雌を TK 測定のみに割り付け、主試験の動物と同じスケジュールで投与した。初回投与時に雌ラットは約11週齢であった。媒体で調製した sotatercept を皮下投与用の被験物質投与液として用いた。生存した雌で交尾が確認された動物はいずれも妊娠13日目に安楽殺し、剖検を実施した。無処置の雄を各投与群に割り付け（各群25匹）、交尾目的でのみ用いた。全てのラットにおいて、生存性、症状観察、体重、体重増加量、摂餌量、交尾能及び受胎能、器官重量、剖検、病理組織学的検査（対照群及び50 mg/kg Q1W 群の雌の卵巣及び子宮頚部を含む子宮のみ）、性周期、並びに卵巣及び子宮内容物の評価を実施した。対照群及び sotatercept 投与群について TK 解析及び免疫原性（ADA）解析を実施した。

被験物質と関連する計画外の死亡が50 mg/kg Q1W 群の2匹でみられた。この2匹は、顕著な運動障害を伴う中等度から重度の後肢の腫脹が認められたため、妊娠5日目又は8日目に安楽殺した。剖検所見として副腎の肥大及び赤色化、並びに中等度から重度の後肢の浮腫が認められた。

15 mg/kg Q1W 以上の用量群で被験物質と関連する有害な変化が認められた。50 mg/kg Q1W 群の5匹では、妊娠期間中に片側性又は両側性の後肢の腫脹あるいは運動障害が認められ、このうち2匹を早期に安楽殺した。50 mg/kg Q1W 群では、交配前の投与期間中に性周期の延長（対照群の4.6日間に対して6.7日間）が認められ、平均周期数の減少（対照群2.4回に対して1.7回）と関連した。受胎率及び妊孕率は、同時対照群のデータ（それぞれ96%及び100%）及び背景対照データと比較して、15 mg/kg Q1W 群（それぞれ80%及び83%）及び50 mg/kg Q1W 群（それぞれ36%及び43%）で低下した。交尾率は、対照群（96%）及び試験実施施設の背景対照値と比較して50 mg/kg Q1W 群（84%）で低下した。15 mg/kg Q1W 群及び50 mg/kg Q1W 群では、妊娠13日目の子宮検査において妊娠率の低下、着床前及び着床後胚損失率の上昇（完全吸収胚の発現頻度の増加を含む）、並びに同腹児数の減少が認められた。15 mg/kg Q1W 群及び50 mg/kg Q1W 群では、副腎の肥大あるいは変色の剖検所見が認められ（病理組織学的検査は実施していない）、他のラットを用いた試験でも同様の所見がみられたことから有害であると考えられた。15 mg/kg Q1W 群及び50 mg/kg Q1W 群では、対照群と比較して子宮頚部を含む妊娠子宮重量（絶対重量及び体重に対する相対重量）が減少し、生存胚数の減少及び着床後胚損失率の上昇と関連した。

50 mg/kg Q1W 群の雌において、卵巣及び子宮の病理組織学的所見は認められなかった（非妊娠子宮でみられた着床部位の欠如を除く）。

以下は sotatercept の投与に起因する変化であるものの、有害ではないと考えられた。15 mg/kg Q1W 以上の用量群で、交配前の投与期間に平均体重の増加（最大7.7%）及び平均体重増加量の増加（対照群に対して最大約2倍）が認められ、摂餌量の増加と関連した。5 mg/kg Q1W 群では、平均着床部位数の減少（対照群の16.3に対して14.5）、平均生存胚数の減少（対照群の1腹あたり15.6に対して13.7）が認められた。ただし、それぞれの値は試験実施施設の背景対照値の範囲内であった。5 mg/kg Q1W 群で認められた子宮頚部を含む妊娠子宮重量（絶対重量及び体重に対する相対重量）の軽度の減少は、生存胚数の減少に起因するものと考えられた。試験の TK パラメータを[表 2.6.6-9]に示す。

表 2.6.6-9　皮下投与後の雌ラットの平均（±SD）血清中 sotatercept 濃度（1 回目及び 3 回目投与）（TT #[redacted]-7863）

Dose	Parameter[a]	5 mg/kg Q1W	15 mg/kg Q1W	50 mg/kg Q1W
First	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	2735 ± 1288	12,300 ± 2659	28,761 ± 4673
	C_{max} (µg/mL)	24.8 ± 9.5	108 ± 28.5	268 ± 60.5
	T_{max} (hr)	91 ± 43	72 ± 34	86 ± 47
Third	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	NR[b]	NR[b]	NR[b]
	C_{max} (µg/mL)	106 ± 64.9	165 ± 60.9	211 ± 104.7
	T_{max} (hr)	NR[b]	NR[b]	NR[b]

$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; hr=hour(s); NR=not reported; Q1W=once weekly; SD=standard deviation; T_{max}=time to reach maximum concentration.

a Sotatercept levels in control samples were all BLQ (0.00098 µg/mL).

b Sotatercept $AUC_{0\text{-}168h}$ and T_{max} values after the 3rd dose were calculated incorrectly in the toxicokinetic report (see Note to File for TT #[redacted]-7863) and are not reported in the CTD. Sotatercept $AUC_{0\text{-}168h}$ values from the 1st dose are used for exposure assessment in this study.

TK 群の動物のうち、中用量群の1匹及び高用量群の1匹で ADA が検出された。抗体産生によりこれらの動物における曝露量が減少した可能性はあるものの、全体として sotatercept 投与群の血清中プロファイルに対する明らかな影響はなかった。

対照群、5 mg/kg Q1W 群、15 mg/kg Q1W 群及び50 mg/kg Q1W 群における ADA の全体の発現率は、それぞれ28匹中0匹、30匹中14匹、30匹中12匹及び30匹中6匹であった。

50 mg/kg Q1W 群の雌2匹の早期安楽殺に基づき、母動物毒性に対する NOAEL は15 mg/kg Q1W であり、そのときの $AUC_{0\text{-}168h}$ は12,300 µg·hr/mL であった。

15 mg/kg Q1W 群及び50 mg/kg Q1W 群で認められた有害な影響に基づき、雌受胎能及び初期胚発生に対する NOAEL は5 mg/kg Q1W であり、そのときの $AUC_{0\text{-}168h}$ は2,735 µg·hr/mL であった。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.2.1 ラットを用いた皮下投与による発生毒性試験（サテライト群でのトキシコキネティクス評価を含む）（TT #[redacted]-7913）

[4.2.3.5.2.1: TT [redacted]7913]

本 GLP 適用試験の目的は、推定妊娠雌 Sprague-Dawley ラットにおいて、着床から硬口蓋閉鎖までの期間に母動物に曝露したときの胚・胎児発生に対する sotatercept の有害な影響を検出することであった[2.6.7.13.A 項]。本試験は ICH ガイドラインの生殖発生ステージ C 及び D を評価するようにデザインされた。

各群28匹の推定妊娠ラットに、PBS で調製した sotatercept を5、15若しくは50 mg/kg の用量で、又は媒体のみを妊娠6日目及び13日目に皮下投与した（計2回投与）。投与容量はいずれの群も 1 mL/kg とした。これらの動物のうち、各群6匹を TK 評価のみに割り付けた。初回投与時にラットは約11週齢であった。生存した雌ラットはいずれも妊娠21日目に安楽殺し、剖検を実施した。評価は、生存性、症状観察、体重及び体重増加量、摂餌量、帝王切開検査、妊娠子宮重量、胎児の肉眼的な外表、軟部組織及び骨格の変化、胎児体重、並びに安楽殺時の母動物体重に基づき実施した。対照群及び sotatercept 投与群について TK 及び免疫原性（ADA）解析を実施した。

主試験のラットはいずれも計画剖検時まで生存した。妊娠15日目（TK 検体の採取期間中）に 50 mg/kg 群の TK 動物1匹が流産し、その後安楽殺した。剖検ではこの動物のいずれの組織も正常であった。この流産は孤発性であったため、被験物質と関連しないと考えられた。被験物質と関連する臨床症状又は剖検所見は認められなかった。

いずれの用量群においても、1回目及び2回目の投与後（妊娠6日目から7日目及び妊娠13日目から14日目）に sotatercept と関連する体重又は体重増加量の変化は認められなかった。5 mg/kg 群及び15 mg/kg 群では、体重、体重増加量及び妊娠子宮重量に対する影響は認められなかった。50 mg/kg 群では、妊娠18日目から21日目に対照群と比較して体重増加量が減少し、有害ではない軽微な摂餌量の減少と関連した。50 mg/kg 群で認められた体重増加量の減少は、本用量群における被験物質と関連する妊娠子宮重量の減少に伴う二次的な変化であると考えられた。妊娠子宮重量で補正後の妊娠21日目における母動物の体重及び累積体重増加量は、各用量群間で同程度であった。

被験物質と関連する着床後胚損失率の上昇が、対照群（8.8%）と比較して50 mg/kg 群（27.9%）で認められた。この変化は、50 mg/kg 群における一腹あたりの平均後期吸収胚数の増加（対照群の0.0に対して2.6）、一腹あたりの平均吸収胚数の全体的な増加（対照群の1.2に対して3.6）、母動物3匹で認められた3匹の死亡胎児、別の母動物で認められた全同腹児の死亡を反映したものであった。これらの着床後胚損失率の上昇を反映して、50 mg/kg 群では平均同腹児数及び生存胎児数が対照群の値と比較して有意に減少した。

5 mg/kg 以上の用量群で、胎児体重の用量依存的な減少が認められた（雌雄合算平均値は対照群に対して9%、15%及び22%減少）。しかし、5 mg/kg 群でみられた胎児体重の減少は軽度であり、平均値は背景対照値の範囲内であったことから、sotatercept の有害な影響ではないと考えられた。

15 mg/kg 群及び50 mg/kg 群では、より程度の大きい胎児体重の減少に起因した胸椎及び腰椎、後肢中足骨あるいは後肢指骨の骨化遅延が認められた。また50 mg/kg 群では、関連する複数の変異の出現頻度の上昇（関連する有意な胸椎数の増加及び腰椎数の減少を伴う過剰肋骨）を反映した骨化点数の有意な変化が認められた。

胎児の肉眼的な外表、軟部組織又は骨格の変化（奇形又は変異）は、50 mg/kg の高用量まで認められなかった。

試験の TK パラメータを[表 2.6.6-10]に示す。

表 2.6.6-10　皮下投与後の妊娠ラットの平均血清中 sotatercept 濃度（妊娠 6 日目及び 13 日目）（TT #[redacted]-7913）

Dose	Parameter[a]	5 mg/kg	15 mg/kg	50 mg/kg
First GD 6	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	6337	11,897	20,002
	C_{max} (µg/mL)	46.6	91.6	153.6
	T_{max} (hr)	72.9	66.2	70.8
Second GD 13	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	2642	5088	19,885
	C_{max} (µg/mL)	NR	NR	NR
	T_{max} (hr)	NR	NR	NR

$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; GD=gestation day; hr=hour(s); NR=not reported; T_{max}=time to reach maximum concentration.

a Sotatercept levels in control samples were all BLQ (0.98 ng/mL).

Q1W で2回投与したとき、血清中 sotatercept 濃度は器官形成期（妊娠6日目から16日目）において用量依存的に維持された。妊娠13日目の投与前の sotatercept 濃度は、各用量群における妊娠6日目の C_{max} の20%以上であった。妊娠13日目の2回目投与後、sotatercept 濃度は妊娠16日目までにプラトーに達し、以後妊娠18日目までに急速に減少した結果、5 mg/kg 群及び15 mg/kg 群では $AUC_{0\text{-}168h}$ が減少した。2回目投与後の急速な消失には ADA が寄与したと考えられる。

被験物質を投与した主試験のラットの64%、サテライト群の TK に用いたラットの83%で抗 sotatercept 抗体が検出された。2回目投与後の抗 sotatercept 抗体の発現による妊娠18日目以前の血清中 sotatercept 濃度の顕著な減少は認められなかった。

以上のデータに基づき、母動物における sotatercept の NOAEL は50 mg/kg であり、そのときの $AUC_{0\text{-}168h}$ は19,885 µg·hr/mL であった。15 mg/kg 以上の用量群で胎児体重の減少及び骨化遅延が認められた。50 mg/kg 群でのみ、全体的な着床後胚損失率の上昇及び生存同腹児数の減少と関連

する後期胎児死亡率の上昇、並びに関連する胸椎数の増加及び腰椎数の減少を伴う過剰肋骨の発現頻度増加が認められた。したがって、15 mg/kg 群において有害な程度でみられた胎児体重減少に基づき、発生に対する NOAEL は5 mg/kg であり、そのときの $AUC_{0\text{-}168h}$ は2,642 µg·hr/mL であった。

2.6.6.6.2.2 ウサギを用いた皮下投与による用量設定発生毒性試験（サテライト群でのトキシコキネティクス評価を含む）（TT #[redacted]-7912）

[4.2.3.5.2.2: TT [redacted]7912]

本試験の目的は、推定妊娠雌 New Zealand White［Hra（NZW）SPF］ウサギに sotatercept を皮下投与し、重要な発生毒性（胚・胎児毒性及び催奇形性）試験で用いる用量を選択するための情報を得ることであった[2.6.7.11 項]。本試験は GLP 非適用下で標準操作手順書に従い実施した。

各群5匹の推定妊娠 New Zealand White ウサギに、PBS で調製した sotatercept を5、15若しくは50 mg/kg の用量で、又は媒体のみを妊娠7日目及び14日目に皮下投与した（計2回投与）。投与容量はいずれの群も1 mL/kg とした（15 mg/kg 群の1.15 mL/kg を除く）。また、5 mg/kg 群、15 mg/kg 群及び50 mg/kg 群に各群3匹を割り付け、同様に投与を実施し TK 評価にのみ用いた。初回投与時にウサギは約6ヵ月齢であった。生存した動物はいずれも妊娠29日目に安楽殺し、剖検を実施した。評価は、生存性、症状観察、体重、体重変化、摂餌量、血液学的検査、剖検、帝王切開及び腹児観察、胎児体重、胎児の性別、並びに胎児の肉眼的な外表変化に基づき実施した。Sotatercept 投与群について TK 及び免疫原性（ADA）解析を実施し、さらに sotatercept 投与群の胎児のプールした血液中の sotatercept 濃度を測定した。

主試験に割り付けた50 mg/kg 群のウサギ2匹で、概して糞量減少、ケージトレイの赤色物質、被毛粗剛、あるいは接触時の冷感などの有害な臨床症状が認められたため、妊娠23日目に人道的に安楽殺した。安楽殺前のその他の変化として、体重及び摂餌量の減少が認められた。TK 評価に割り付けた5 mg/kg 群の1匹及び50 mg/kg 群の2匹で流産が認められた（後に動物は安楽殺した）。流産したウサギでみられた臨床症状は、安楽殺した主試験の動物と同様であった。これらの死亡及び流産は、sotatercept と関連するものであると推察された。

生存した動物における被験物質と関連する有害な臨床症状として、50 mg/kg 群の5匹中3匹でのケージトレイの赤色物質、並びに15 mg/kg 群の3匹及び50 mg/kg 群の2匹で眼瞼の赤色化あるいは腫脹が認められた。

剖検では、心嚢液貯留が5 mg/kg 群の1匹、15 mg/kg 群の1匹及び50 mg/kg 群の3匹で認められた。

15 mg/kg 群では投与後期間（妊娠15日目から29日目）を通して体重減少が認められ、同期間に50 mg/kg 群では体重増加量の減少がみられた。50 mg/kg 群で認められた全体的な体重増加量の減少は、対照群と比較したときの妊娠15日目から20日目までの体重減少及び妊娠25日目から29日目

までの体重増加抑制を反映したものである。全体的には、15 mg/kg 群及び50 mg/kg 群において、投与期間及び投与後期間（妊娠7日目から29日目）に対照群と比較して体重増加量が減少した。

15 mg/kg 群及び50 mg/kg 群では、対照群と比較して着床後の胚損失（すなわち、早期及び後期吸収胚並びに着床後胚損失率）が増加した。50 mg/kg 群の母動物1匹では、全受胎産物の吸収が認められた。これらの着床後の胚損失の増加を反映し、15 mg/kg 群及び50 mg/kg 群では対照群と比較して平均同腹児数及び平均生存胎児数の減少、並びに一腹あたりの受胎産物の吸収率の上昇が認められた。

5 mg/kg 以上の用量群で胎児体重（雄、雌及び雌雄合算）の減少が認められた（雌雄合算の胎児体重は5 mg/kg 群、15 mg/kg 群及び50 mg/kg 群で対照群に対してそれぞれ14%、35%及び23%減少）。

その他の腹児パラメータ、帝王切開、摂餌量又は血液学的検査値の変化は、50 mg/kg の高用量まで認められなかった。一腹あたりの黄体数、着床数及び雄胎児生存率の平均値は4群間で同程度であった。計画剖検時まで生存した動物では、死亡胎児は認められなかった。胎盤の外観は全て正常であった。

試験の TK パラメータを[表 2.6.6-11]に示す。

表 2.6.6-11　皮下投与後の妊娠ウサギ血清中 sotatercept の平均 TK パラメータ：妊娠 7 日目及び 14 日目（TT #[redacted]-7912）

Dose	Parameter	5 mg/kg	15 mg/kg	50 mg/kg
First GD 7	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)[a]	5765	23,682	52,327
	C_{max} (µg/mL)	46.6	213.0	416.9
Second GD 14	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)[a]	5246	28,120	45,735
	C_{max} (µg/mL)	46.9	331.9	348.0

$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; C_{max}=observed maximum concentration; GD=gestation day; TK=toxicokinetic(s).

a For the 15 mg/kg group, exposure is area under the serum concentration-time curve from time 0 to 144 hours postdose ($AUC_{0\text{-}144h}$).

妊娠ウサギにおける血清中 sotatercept 濃度は用量依存的であり、2週間にわたり維持された。平均 AUC 比（試験2週目／1週目）は1.01であり、Q1W で投与したときに蓄積傾向は認められなかった。

妊娠29日目において、各用量群のプールした胎児血清検体中で sotatercept が検出されたことから、sotatercept は妊娠終了時までに胎盤関門を通過する可能性があることが示された[表 2.6.6-12]。胎児中濃度は、母動物血清中濃度の1%～39%であった[2.6.5.7 項]。

表 2.6.6-12　皮下投与後の胎児ウサギの平均血清中 sotatercept 濃度：妊娠 29 日目（TT #[redacted]-7912）

	Dose Group		
Parameter	5 mg/kg	15 mg/kg	50 mg/kg
Mean Fetal Concentration (µg/mL)	0.425	1.30	0.34
Mean Maternal Concentration (µg/mL)	1.08	5.44	32.6
Percent (Fetal/Maternal)	39%	24%	1%

ADA は妊娠14日目にのみ5 mg/kg 群の1匹で検出され、この動物の血清中 sotatercept 濃度に対する明らかな影響は認められなかった。

以上のデータに基づき、妊娠ウサギを用いた発生毒性試験では sotatercept を15 mg/kg 以下の用量で、妊娠7日目及び14日目に皮下投与することが推奨された。

2.6.6.6.2.3　ウサギを用いた週1回皮下投与による GLP 適用の胚・胎児発生毒性試験（TT #[redacted]-7841）

[4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841]

本 GLP 適用試験の目的は、推定妊娠雌 New Zealand White［Crl:KBL（NZW）］ウサギにおいて、着床から硬口蓋閉鎖までの期間に母動物に曝露したときの胚・胎児発生に対する sotatercept の有害な影響を評価することであった[2.6.7.13.B 項]。本試験は ICH ガイドラインの生殖発生ステージ C から D を評価するようにデザインされた。また、sotatercept の TK あるいは免疫原性を評価した。

各群20匹の推定妊娠 New Zealand White ウサギに、媒体（[redacted]）、又は sotatercept を0.5、1.5若しくは5 mg/kg の用量で、妊娠7日目及び14日目に皮下投与した（計2回投与）。投与容量はいずれの動物も1 mL/kg とした。また、各群3匹のウサギを TK 及び ADA 評価に割り付けた。初回投与時にウサギは4～6ヵ月齢であった。媒体で調製した sotatercept を皮下投与用の被験物質投与液として用いた。全てのウサギは妊娠29日目に安楽殺し、剖検を実施した。評価は、生存性、症状観察、体重、体重増加量、摂餌量、剖検、卵巣及び子宮検査、胎児体重及び性別、並びに胎児の外表、内臓、頭部及び骨格観察に基づき実施した。対照群及び sotatercept 投与群について TK 及び免疫原性（ADA）解析を実施した。

全てのウサギが計画剖検時まで生存し、いずれの用量群においても母動物パラメータに被験物質と関連する影響は認められなかった。

5 mg/kg 群では平均着床後胚損失率の上昇に伴い、平均生存胎児数の減少が認められた。また、1.5 mg/kg 群及び5 mg/kg 群では用量依存的な平均胎児体重（雄、雌及び雌雄合算）の減少が認め

られ（雌雄合算の胎児体重は対照群に対してそれぞれ13%及び18%低下）、5 mg/kg 群における平均骨化点数（中手骨、前肢指骨、後肢指骨）の減少と関連した。

いずれの用量群においても sotatercept と関連する胎児異常（奇形又は変異）は認められなかった。

試験の TK パラメータを[表 2.6.6-13]に示す。

表 2.6.6-13　皮下投与後の妊娠ウサギ血清中 sotatercept の平均（±SD）TK パラメータ：妊娠 7 日目及び 14 日目（TT#[redacted]-7841）

Dose	Parameter[a]	0.5 mg/kg	1.5 mg/kg	5 mg/kg
First GD 7	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	686 ± 75.3	1880 ± 147	5150 ± 1590
	C_{max} (µg/mL)	5.23 ± 0.409	13.7 ± 0.612	40.7 ± 7.40
	T_{max} (hr)	Ranged from 48 hr to 168 hr across the dose range		
Second GD 14	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	796 ± 478	1630 ± 788	7800 ± 749
	$AUC_{0\text{-}366h}$ (µg·hr/mL)	1070 ± 388	1780 ± 962	10,900 ± 1900
	C_{max} (µg/mL)	6.89 ± 3.48	17.6 ± 3.67	61.5 ± 6.92
	T_{max} (hr)	Ranged from 24 hr 168 hr across the dose range		

$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; $AUC_{0\text{-}366h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 366 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; GD=gestation day; hr=hour(s); SD=standard deviation; TK=toxicokinetic(s); T_{max}=time to reach maximum concentration.

a Sotatercept levels in control samples collected 48 hr after the GD 7 and 14 doses ranged from 0.042 to 0.081 µg/mL (BLQ <0.04 µg/mL). Control concentrations were 1% to 2% of that achieved at the lowest dose and did not impact the quality or integrity of the study.

抗 sotatercept 抗体の大部分が2回目投与後の妊娠29日目に検出され、対照群の23匹中1匹（4.3%）、0.5 mg/kg 群の23匹中10匹（43.5%）、1.5 mg/kg 群の23匹中10匹（43.5%）及び5 mg/kg 群の23匹中8匹（34.8%）で検出された。Sotatercept 投与動物における総発現率は40.6%であった。TK 評価に割り付けた動物のうち、0.5 mg/kg 群の1匹及び1.5 mg/kg 群の2匹では、ADA が妊娠14日目における sotatercept の曝露量に影響を及ぼしたと考えられた。

結論として、妊娠ウサギに sotatercept を妊娠7日目及び14日目に皮下投与（計2回投与）したときの母動物の NOAEL は5 mg/kg であり、そのときの $AUC_{0\text{-}366h}$ は10.900 µg·hr/mL であった。5 mg/kg 群では発生毒性（平均着床後胚損失率の上昇、平均生存胎児数の減少、平均胎児体重の減少及び平均骨化点数の減少）が認められた。また、1.5 mg/kg 群では平均胎児体重の減少が認められた。以上の結果に基づき、発生に対する NOAEL は0.5 mg/kg であり、本用量における妊娠14日目の母動物の $AUC_{0\text{-}366h}$ は1,070 µg·hr/mL であった。

2.6.6.6.3 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

2.6.6.6.3.1 ラットを用いた皮下投与による GLP 適用の発生及び出生前／出生後の生殖に関する試験（出生後の行動／機能評価を含む）（TT #[redacted]-7830）

[4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]

本試験の目的は、Sprague-Dawley［Crl:CD（SD）］ラットにおいて、着床から授乳及び離乳期間を通して妊娠雌動物に曝露したときの出生児の発生に対する sotatercept の有害な影響を評価することであった[2.6.7.14 項]。本試験は ICH ガイドラインの生殖発生ステージ C から F を評価するようにデザインされた。なお、帝王切開による胎児の評価（ステージ C 及び D）は補足的試験で実施されたため含まれていない。本期間中に誘発される影響は遅発性の場合があることから、F_1世代のラットを性成熟に達するまで評価した。また、sotatercept の ADA による F_0世代の雌に対する影響を評価した。

交配した雌 Sprague-Dawley ラット計132匹を、各群22匹の6群に無作為に割り付けた。ラットに反復投与したとき、ADA 産生により全身曝露量が減少することが判明しているため、本試験の F_0世代の母動物に対する sotatercept の投与は妊娠期又は授乳期のいずれかに実施した。

推定妊娠雌ラットに sotatercept（媒体で調製）あるいは代替物質（生理食塩水）、又は媒体対照（[redacted]）を、妊娠6日目及び13日目、又は授乳1日目、8日目及び15日目に皮下投与した。妊娠期に投与した F_0雌ラット（2群）では、妊娠6日目及び13日目に sotatercept をそれぞれ1.5又は5 mg/kg の用量で投与した後、授乳1日目、8日目及び15日目に生理食塩水を投与した。授乳期に投与した F_0雌ラット（3群）では、妊娠6日目及び13日目に生理食塩水を投与した後、授乳1日目、8日目及び15日目に sotatercept をそれぞれ1.5、5又は10 mg/kg の用量で投与した。F_0世代の対照ラットには、妊娠6日目及び13日目に生理食塩水を投与した後、授乳1日目、8日目及び15日目に媒体を投与した。いずれの投与物質も投与容量は1 mL/kg とした。F_0世代の雌ラットは自然分娩させた。授乳21日目に F_1世代の雌雄を離乳させ、出生児264匹（F_0世代の各群母動物1匹につき雌雄各1匹）を選択して成長及び行動に対する影響を評価した。母動物及び評価に用いなかった出生児はいずれも分娩後の授乳21日目に安楽殺した。本試験では F_1世代のラットに対する sotatercept、生理食塩水又は媒体の直接的な投与は実施しなかった。

全ての F_0世代のラットにおいて、評価は生存性、症状観察、体重、体重増加量、摂餌量、自然分娩及び母動物の観察、卵巣及び子宮検査、並びに剖検に基づき実施した。全ての F_0世代のラットから妊娠6日目の投与開始前（対照群及び妊娠期投与群のみ）、並びに授乳1日目及び授乳21日目の剖検前（全ての群）に、抗 sotatercept 抗体の評価のため血液検体を採取した。

全ての F_1世代のラットにおいて、評価は生存性、症状観察、体重、性成熟、自発運動、聴覚性驚愕馴化、学習及び記憶（モリス水迷路）、交配、卵巣及び子宮検査、並びに剖検に基づき実施した。

いずれの F_0世代の雌も計画剖検時まで生存した。F_0世代の雌では、妊娠又は授乳期間中に、症状観察、平均母動物体重又は体重増加量、自然分娩、母動物の行動及び剖検のいずれのパラメータにも sotatercept と関連する影響は認められなかった。

F_0世代の雌で認められた被験物質と関連する変化は、10 mg/kg 授乳期投与群における授乳10日目から15日目までの平均母動物摂餌量の減少のみであり、関連する臨床症状又は体重に対する影響がみられなかったことから有害ではないと考えられた。

妊娠期又は授乳期に投与したいずれの用量群の F_0世代においても、分娩した母動物数、妊娠期間、分娩した母動物あたりの着床部位数、出産率（生存児の分娩に至った妊娠動物の割合）、生存児及び死産児の数、生存率（出生から授乳4日目まで生存した出生児の割合）、授乳率（離乳まで生存した出生児の割合）、一腹あたりの生存児数、性比、並びに体重測定時の生存同腹児数を評価したときの出生児に対する影響は認められなかった。

妊娠期又は授乳期に投与した F_0動物（妊娠期投与動物は授乳1日目及び21日目に、授乳期投与動物では授乳21日目のみに採血）のうち、ADA が検出された動物は対照群では22匹中2匹（9.1%）、1.5 mg/kg 妊娠期投与群では22匹中7匹（31.8%）、5 mg/kg 妊娠期投与群では22匹中16匹（72.7%）、1.5 mg/kg 授乳期投与群では21匹中4匹（19.0%）、5 mg/kg 授乳期投与群では20匹中7匹（35.0%）、10 mg/kg 授乳期投与群では21匹中3匹（14.3%）であり、sotatercept 投与動物における総抗体発現率は34.9%（106匹中37匹）であった。

F_1世代の雌雄出生児の離乳前及び離乳後に、被験物質と関連する死亡又は有害な臨床症状はいずれの用量群においても認められなかった。

妊娠期に sotatercept を1.5及び5 mg/kg の用量で投与した母動物の出生児では、離乳前の生後1日目にのみ被験物質と関連する一過性の平均出生児体重の減少（雄、雌及び雌雄合算、対照群との比較）が認められたが、有害ではないと考えられた。

授乳期に5 mg/kg 以上の用量を投与した母動物の出生児では、体重及び体重増加量の減少が認められ、その程度及び発現時期は用量依存的であった。離乳前の平均出生児体重は、5 mg/kg 授乳期投与群の雄で減少し（生後15日目から発現、対照群に対して9%から13%低下）、10 mg/kg 授乳期投与群の雌雄でも減少した（雄で生後8日目、雌で生後10日目から発現、対照群に対して9%から20%低下）。また、5 mg/kg 授乳期投与群の雌では、平均体重が離乳前期間の終了時までに減少した（生後21日目に対照群に対して9%低下）。これらの出生児では、体重及び体重増加量の減少は離乳後期間においても継続して認められた。5 mg/kg 授乳期投与群の雌雄では、離乳後の体重増加量の減少が複数の測定間隔で認められ、そのため離乳後期間全体における体重増加量が減少した（対照群と比較して、雄では生後22日目から106日目に11%低下、雌では生後22日目から92日目に4%低下）。同様に、10 mg/kg 授乳期投与群の雌雄では、雄では全て、雌では大部分の測定間隔で離乳後の体重増加量の減少が認められ、そのため離乳後期間全体における体重増加量が減少した（雄では生後22日目から106日目に15%低下、雌では生後22日目から92日目に8%低下）。

結果的に、5 mg/kg 授乳期投与群及び10 mg/kg 授乳期投与群での平均体重は、離乳後期間を通して低値を維持した（対照群と比較して、5 mg/kg 授乳期投与群の雄では生後106日目に11%低下、雌では生後92日目に5%低下、10 mg/kg 授乳期群の雄では生後106日目に16%低下、雌では生後92日目に10%低下）。また、10 mg/kg 授乳期投与群の雌の妊娠期間中の平均体重増加量は対照群と同様であったものの、その前に体重増加量の減少が認められたため、妊娠期間中の平均体重は低値を維持した（対照群と比較して8%低下）。以上より、5 mg/kg 授乳期投与群及び10 mg/kg 授乳期投与群で離乳前から離乳後まで継続して sotatercept と関連する体重及び体重増加量の減少が認められ、その結果として成熟後の平均体重が減少した。したがって、これらの影響は有害であると考えられる。

5 mg/kg 以上の授乳期投与群の F_1動物で性成熟の遅延が認められ、本投与群で認められた出生児体重の減少に起因する二次的な影響であると考えられた。F_1世代では、5 mg/kg 授乳期投与群及び10 mg/kg 授乳期投与群の雄で平均包皮分離日数の増加（対照群と比較してそれぞれ+3.1日及び+3.5日）、並びに10 mg/kg 授乳期投与群の雌で平均膣開口日数の増加（対照群と比較して+2.4日）が認められた。1.5 mg/kg 授乳期投与群では性成熟に対する影響は認められず、F_0世代の妊娠期に投与したときの F_1世代にも変化は認められなかった。また、母動物への投与時期にかかわらず、いずれの用量においても F_1動物の雌雄生殖機能に対する影響は認められなかった。

聴覚性驚愕反応、自発運動及びモリス水迷路の評価において、被験物質と関連する影響は認められなかった。

母動物への投与時期にかかわらず、F_1世代において sotatercept と関連する剖検所見は認められず、黄体数、着床数、着床前胚損失率、生存胚数及び死胚数、並びに着床後胚損失率により評価した卵巣及び子宮パラメータに変化はみられなかった。

結論として、妊娠雌ラットに sotatercept を1.5及び5 mg/kg の用量で妊娠6日目及び13日目に、又は1.5、5及び10 mg/kg の用量で授乳1日目、8日目及び15日目に皮下投与したとき、sotatercept の忍容性は良好であった。F_0母動物に対する被験物質と関連する影響は、10 mg/kg 授乳期投与群で認められた一過性の、有害ではない摂餌量の減少のみであった。したがって、妊娠期又は授乳期に投与したときの母動物に関する sotatercept の NOAEL は5 mg/kg 又は10 mg/kg であった。生殖に対する NOAEL は、妊娠期投与時が5 mg/kg、授乳期投与時が10 mg/kg であった。5 mg/kg 授乳期投与群及び10 mg/kg 授乳期投与群では、F_1世代の雌雄において出生児体重、出生児体重増加量、あるいは性成熟に対する sotatercept と関連する有害な影響が認められた。母動物への sotatercept の投与と関連する、出生児の死亡、臨床症状、自発運動、学習及び記憶（聴覚性驚愕反応又はモリス水迷路）、交尾能及び受胎能、又は卵巣及び子宮パラメータに関する F_1世代への影響は認められなかった。以上のデータに基づき、妊娠期又は授乳期の妊娠ラットに sotatercept を投与したときの出生児の生存及び成長に対する NOAEL は、それぞれ5 mg/kg 又は1.5 mg/kg であった。

2.6.6.6.4 出生児（幼若動物）を用いた試験

2.6.6.6.4.1 幼若ラットを用いた回復期間を伴う12週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7832）

[4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7832]

本 GLP 試験の目的は、幼若 Sprague-Dawley ラットに生後7日目から91日目まで Q1W で皮下投与し、13週間の回復期間を設けたときの sotatercept の発育及び発達、神経行動学的発達並びに免疫応答能及び生殖機能に対する影響を明らかにすることであった[2.6.7.11 項]。

幼若 Sprague-Dawley ラットに、sotatercept を生後7日目から91日目まで Q1W で計13回皮下投与した。Sotatercept は媒体（[redacted]）で調製し、0（媒体）、0.3、3又は30 mg/kg の用量で投与した。いずれの投与物質も投与容量は1 mL/kg とした。各群雌雄各10匹（主試験動物、サブセット1）及び各群雌雄各20匹（回復性試験動物、サブセット2）をそれぞれ生後98日目（投与期間終了時）、及び生後238日目又は239日目（13週間の回復期間終了時）における毒性のエンドポイントの評価に割り付けた。別途設定した群の動物にも投与を実施し、sotatercept の TK パラメータ及び ADA の測定（各群雌雄各21～24匹、サブセット3）、並びに TDAR 及びイムノフェノタイピング評価（対照群、0.3 mg/kg Q1W 群及び 3 mg/kg Q1W 群につき各群雌雄各20匹、サブセット4）に用いた。幼若ラットは、死亡、症状観察、摂餌量、体重、性成熟、自発運動、FOB 及びモリス水迷路のエンドポイント、性周期、生殖能、血中ホルモン濃度（FSH、LH、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオール及び EPO）、TDAR 及びイムノフェノタイピングパラメータ、骨密度評価（大腿骨）、並びに臨床病理学的及び病理学的検査項目について評価した。また、血清を用いた TK（対照動物及び sotatercept 投与動物）及び ADA の評価を実施した。

尿検査値、EPO、FOB パラメータ又はモリス水迷路の成績には、被験物質と関連する変化は認められなかった。

30 mg/kg Q1W 群では、被験物質と関連する計画外の死亡が多数認められ、生存動物においても臨床症状の悪化がみられたため、生後30日目（3回投与後）に試験を中止した。30 mg/kg Q1W 群では、脱水、削痩、自発運動の低下あるいは被毛粗剛が頻繁に認められ、体重増加量の減少と関連した。30 mg/kg Q1W 群における臨床病理学的検査値の変化として、概して薬理学的作用を介した赤血球量の増加、肝トランスアミナーゼの増加及び腎障害を示唆するパラメータの変化［雌雄において対照群と比較して、軽度の BUN（最大3.31倍）、クレアチニン（雄のみ：1.68倍）、リン（最大1.75倍）及びカリウム（最大1.49倍）の濃度の増加］が認められた。30 mg/kg Q1W 群における被験物質と関連する病理検査所見として、概して腎臓の赤色化といった剖検所見並びに腎臓の尿細管の拡張／萎縮／低形成／鉱質沈着、腎髄質の出血／うっ血、副腎のうっ血／空胞化、腺胃粘膜の鉱質沈着及び脾臓の白脾髄あるいは辺縁帯の細胞充実性の低下を含む組織形態学的所見が認められた。

3 mg/kg Q1W 以下の用量群では、TK 及び ADA 測定に割り付けた動物（サブセット3）又は TDAR 及びイムノフェノタイピングに割り付けた動物（サブセット4）において被験物質と関連する計画外の死亡はみられなかった。

主試験動物のうち、3 mg/kg Q1W 群で投与期間中に認められた被験物質と関連する生前所見は、30 mg/kg Q1W 群でみられた所見と類似していたが、概して程度が低かった。主試験動物の 3 mg/kg Q1W 群では、被験物質と関連する計画外の死亡、有害な臨床症状、雌雄の平均体重及び体重増加量の減少（雌では一過性）、並びに雄の摂餌量の減少が認められた。この他の 3 mg/kg Q1W 群における投与期間中の生前所見として、雌雄の性成熟の遅延（体重に対する影響に伴う二次的な所見と考えられる）及び雄の自発運動量評価時の総移動時間の短縮が認められた。主試験動物の0.3 mg/kg Q1W 群で投与期間中に認められた臨床症状は、一過性の四肢の機能制限のみであった。

主試験動物の0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群における投与期間中の被験物質と関連する臨床病理学的変化として、赤血球量を示すパラメータの軽微から軽度の増加（雌雄において対照群と比較して、RBC が最大1.24倍、HGB が最大1.18倍、HCT が最大1.20倍）が認められた。3 mg/kg Q1W 群では、その他の変化として白血球パラメータの軽微な増加（雌のみにおいて対照群と比較して、白血球数が1.29倍、好中球数が3.53倍、単球数が1.83倍）、フィブリノゲンの軽微な増加、血小板の軽微な減少が認められた。0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で認められた腎毒性を示唆する血液生化学的検査値の変化（BUN、クレアチニンあるいはリンの軽度の増加及びアルブミンの軽度の減少）は、腎臓の病理組織学的所見と関連した。

主試験動物（対照群、0.3 mg/kg Q1W 群及び3 mg/kg Q1W 群）では、生後98日目の計画剖検時において、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で sotatercept と関連する影響として、精巣（異常な硬化及び小型化）、前立腺（小型化）あるいは腎臓（変色、液の充満した嚢胞）の剖検所見が認められた。器官重量の変化として、0.3 mg/kg Q1W 以上の雄で心臓重量の減少、3 mg/kg Q1W 群で精巣／精巣上体、前立腺及び脾臓（雌のみ）の重量の減少並びに腎臓重量の増加が認められた。

主試験動物では生後98日目に、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群で組織形態学的所見として、軽微から軽度の尿細管の鉱質沈着、軽微からやや重度の尿細管の拡張、軽微から中等度の慢性進行性腎症、軽微から中等度の膜性増殖性糸球体腎炎、軽微から軽度の出血、軽微から中等度の髄質の尿細管の萎縮／低形成及び髄質の間質の増加が認められた。0.3 mg/kg Q1W 以上の雄及び 3 mg/kg Q1W 群の雌で、軽微から軽度の腺胃粘膜の鉱質沈着が認められた。0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群ではやや重度から重度の精細管の変性及び萎縮、並びに軽度から中等度の精巣の浮腫が認められた。3 mg/kg Q1W 群の精巣で軽微から軽度のライディッヒ細胞の過形成がみられ、前立腺及び精嚢腺で軽微から軽度の萎縮が認められた。0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群の精巣上体では、軽微から軽度の細胞残屑の増加を伴うやや重度の精子の減少が認められ、精巣の変性／萎縮による二次的な変化であると考えられた。脾臓では、3 mg/kg Q1W 群の雄及び0.3 mg/kg Q1W 以上の雌で、細動脈周囲鞘あるいは白脾髄辺縁帯の細胞充実性の低下、赤脾髄の髄外造血の低下、ある

いは赤脾髄の細胞充実性の増加が認められた。0.3 mg/kg Q1W 以上の雌の骨髄では、未熟（芽球）骨髄球系細胞数（島）の減少が認められ、赤血球系細胞及び好中球の相対数又は絶対数の増加を伴った。0.3 mg/kg Q1W 以上の雌数匹の胸腺で、皮質及び髄質の単細胞壊死の増加が認められた。雌のみで、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群の副腎皮質及び3 mg/kg Q1W 群の下垂体前葉／中葉における細胞肥大が認められた。

回復期間中に、3 mg/kg Q1W 群の1匹で被験物質と関連する計画外の死亡がみられた。臨床症状及び病理検査所見は、投与期間中に死亡した3 mg/kg Q1W 群の動物で認められた所見と概して類似した。0.3 mg/kg Q1W 群では、回復期間中に被験物質と関連する計画外の死亡はみられなかった。

3 mg/kg Q1W 以下の用量群では、回復期間中に被験物質と関連する臨床症状は認められなかった（計画外死亡動物で認められた所見を除く）。

雄でのみ、3 mg/kg Q1W 群で体重減少が回復期間中も持続して認められたものの、同居前には完全に回復した。

3 mg/kg Q1W 以下の用量群では、回復期間中に摂餌量の変化は認められなかった。

生後237日目から239日目の回復性試験動物では、被験物質と関連する臨床病理学的検査値の変化は概して軽微から軽度であり、3 mg/kg Q1W 群の雌における赤血球量の増加、3 mg/kg Q1W 群の雌における血小板の減少、3 mg/kg Q1W 群の雄におけるフィブリノゲンの増加、3 mg/kg Q1W 群の雄におけるアルブミンの減少及び0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群におけるコレステロールの増加が認められたのみであった。回復期間中に交配させた sotatercept を投与した雌における妊娠13日目の臨床病理学的検査値の変化は、3 mg/kg Q1W 群における軽微な ALT、AST 及びグルコースの増加、並びに0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群における軽度のコレステロールの増加が認められたのみであった。

回復期間中に、雌雄の受胎率の低下、3 mg/kg Q1W 群の雄と交配した無処置の雌における妊娠率の低下及び0.3 mg/kg Q1W 以上の雌における妊娠率の低下が認められた。Sotatercept を投与した雌では、3 mg/kg Q1W 群で死胚を有する動物（死胚のみを有する母動物1匹を含む）の割合の増加も認められた。

回復期間終了時（生後238／239日目）に、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群の回復性試験動物における sotatercept と関連する病理検査所見は、投与期間終了時に認められた所見と同様であり、精巣及び腎臓の剖検所見、精巣、前立腺、腎臓及び心臓の器官重量の変化、並びに腎臓、胃、精巣（ライディッヒ細胞の過形成を除く）及び脾臓の病理組織学的所見が認められた。0.3 mg/kg Q1W 群の雌の副腎では、皮質の肥大は認められなかったものの、3 mg/kg Q1W 群で嚢胞変性の発現頻度が増加した。下垂体、骨髄又は胸腺に所見は認められなかった。

3 mg/kg Q1W 群でのみ、軽度の血中ホルモン濃度の変化が認められた。投与期間終了時に、雄で LH の増加、雌で LH 及び FSH の減少が認められた。回復期間終了時には雄のみで LH 及び

FSH の増加が認められた。これらの変化と被験物質の投与との関連は不明であり、毒性学的に意味のあるものではないと考えられた。

骨密度評価では、主試験動物の0.3 mg/kg Q1W 群において、投与期間終了時に BMC 及び BMD（大腿骨全体、近位部、中央部及び遠位部）の軽度の増加が認められたが、ホルモンに対する影響は伴わなかった。0.3 mg/kg Q1W 群ではその差が軽微であり用量依存的でないものの、雌雄間で一貫しており、sotatercept と関連すると考えられた。回復期間終了時には、3 mg/kg Q1W 群の雄で大腿骨全体及び近位部の BMD、並びに中央部の BMC 及び BMD が統計学的に有意に低下したものの、sotatercept の投与との関連は不明であった。

本試験で得られた TK パラメータを[表 2.6.6-14]に示す。

表 2.6.6-14　皮下投与後の幼若ラット血清中 sotatercept の平均（±SE）TK パラメータ：生後 7 日目及び 91 日目（TT #[redacted]-7832）

		PND 7		PND 91	
Dose[a] (mg/kg Q1W)	Sex	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)
0.3	Male	2.61 ± 0.127	253 ± 28.6	5.27 ± 0.160	811 ± 39.5
	Female	2.38 ± 0.065	226 ± 19.2	5.93 ± 0.507	850 ± 58.0
	Combined	2.49 ± 0.0811	239 ± 17.0	5.6 ± 0.280	830 ± 32.5
3	Male	24.5 ± 1.71	2550 ± 204	29.6 ± 2.81	4380 ± 361
	Female	122 ± 5.67 23.4 ± 1.40[b]	7550 ± 318 2390 ± 186[b]	26.0 ± 10.9	3680 ± 1270
	Combined	67.4 ± 24.5 24.0 ± 1.02[b]	5050 ± 1180 2470 ± 130[b]	27.3 ± 3.73	4110 ± 473
30[c]	Male	158 ± 19.8	18,400 ± 1980	NA	NA
	Female	180 ± 5.32 180 ± 5.32[b]	17,900 ± 1040 20,500 ± 1040[b]	NA	NA
	Combined	169 ± 10.4 169 ± 10.4[b]	18,200 ± 1190 19,400 ± 1030[b]	NA	NA

$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; NA=not applicable; PND=postnatal day; Q1W=once weekly; SE=standard error; TK=toxicokinetic(s).

a Sotatercept concentrations in control samples were BLQ (0.04 µg/mL).

b An investigation into the bioanalytical data from PND 7 suggested that the 3 mg/kg Q1W 96 hour samples and the 30 mg/kg Q1W 72 hour samples were reversed during sample analysis. These TK values were obtained when the concentration data were reversed to address the potential error.

c The 30 mg/kg Q1W dose group was terminated on PND 30.

Sotatercept を Q1W で12週間投与したとき、用量範囲全体（0.3～3 mg/kg Q1W）における sotatercept の曝露量は雄で1.7～3.2倍、雌で1.5～3.8倍に増加した。

生後128日目に評価した動物で ADA は検出されなかった。しかし、妊娠13日目には 0.3 mg/kg Q1W 群の雌1匹及び3 mg/kg Q1W 群の雌1匹で、また生後239日目に3 mg/kg Q1W 群の雄1匹で ADA が検出された。一部の時点では、循環血中 sotatercept 濃度の上昇により ADA の検出が妨害され、偽陰性となった可能性がある。

投与期間中及び回復期間中に、TDAR 及びイムノフェノタイピング評価を実施した。3 mg/kg Q1W 群では投与期間中に KLH に対する T 細胞依存性 IgM 抗体反応の低下が認められたものの、IgG 抗体反応に変化はみられなかった。回復期間中も維持した各群雌雄各2匹から6匹において、3 mg/kg Q1W 以下の用量群では KLH 特異的 IgM 又は IgG 産生に対する識別可能な影響は認められなかった。

被験物質と関連するイムノフェノタイピング検査における変化として、0.3 mg/kg Q1W 以上の雌雄で、生後56日目に対照群と比較して CD45陽性リンパ球数の用量依存的な増加傾向（統計学的に有意）が認められ、その結果として総 T 細胞、B 細胞、CD4陽性 T 細胞及び CD8陽性 T 細胞の絶対数が用量依存的に増加した。Sotatercept 投与群間において、NK 細胞の絶対数に有意な差は認められなかったものの、3 mg/kg Q1W 群の雄、並びに0.3 mg/kg Q1W 群及び3 mg/kg Q1W 群の雌では、CD45陽性リンパ球の絶対数の増加により、NK 細胞の割合が統計学的に有意に低下した。0.3 mg/kg Q1W 群及び3 mg/kg Q1W 群の雌では、T 細胞の割合が統計学的に有意に低下したものの、これらの動物における T 細胞の絶対数は対照群と比較して全体的に増加した。3 mg/kg Q1W 群の雄では、対照群と比較して B 細胞の割合の統計学的に有意な増加が認められ、CD45陽性リンパ球数の増加、B 細胞の絶対数の増加を伴った。T 細胞／B 細胞比率は、sotatercept を投与した雄で B 細胞に比例して T 細胞が減少する統計学的に有意な傾向を示した。全体として、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量群でリンパ球サブセットの動的変化が認められた。これらの軽微から軽度の変化（B 細胞が2～3倍、総リンパ球、T 細胞及び NK 細胞が2倍未満）は、抗原（KLH）投与後のリンパ球活性化における軽度かつ一過性の影響を反映しており、毒性学的意義はほとんどないと考えられた。

回復期間中の評価のために維持した動物数が少なかったため（各群雌雄各2匹から6匹）、イムノフェノタイピング検査でみられた変化の回復性については明らかにすることはできなかった。

結論として、回復性を示さなかった有害な臨床病理学的検査値の変化及び病理検査所見、並びに回復期間中に認められた雌の受胎率及び妊娠率の低下に基づき、本試験の NOEL 及び NOAEL は0.3 mg/kg Q1W 未満であった。

2.6.6.6.4.2 幼若ラットを用いた回復期間を伴う13週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7864）

[4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]

本 GLP 試験の目的は、幼若 Sprague-Dawley ラットに生後7日目から91日目まで Q1W で皮下投与し、18週間の回復期間を設けたときの sotatercept の発育及び発達、神経行動学的発達、免疫応答能並びに生殖機能に対する影響を明らかにすることであった[2.6.7.15 項]。

幼若 Sprague-Dawley ラットに sotatercept を生後7日目から91日目まで、Q1W で計13回皮下投与した。Sotatercept は媒体（[redacted]）で調製

し、0（媒体）、1、3又は10 mg/kg の用量で投与した。いずれの投与物質も投与容量は1 mL/kg とした。毒性の評価は、各群雌雄各10匹（主試験動物、サブセット1）では投与期間終了時（生後98日目）まで、各群雌雄各20匹（回復性試験動物、サブセット2）では18週間の回復期間終了時（雌の妊娠15日目、雄の生後233日目）まで実施した。サブセット1のラットでは、生後98日目に追加投与を実施した。別途設定した群の動物に投与を実施し、sotatercept の TK パラメータ及び ADA の測定（各群雌雄各24匹及び雌雄各6匹からなる対照群、サブセット3）、並びに TDAR 及びイムノフェノタイピング評価を実施した（各群雌雄各20匹、サブセット4）。幼若ラットは、死亡、症状観察、摂餌量、体重、性成熟、自発運動、FOB、学習及び記憶（ビール型迷路）のエンドポイント、性周期、生殖能、血中ホルモン濃度（FSH、LH、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオール及び EPO）、TDAR 及びイムノフェノタイピングのパラメータ、骨密度評価（大腿骨）、並びに臨床病理学的及び病理学的検査項目について評価した。また、血清を用いた TK（対照動物及び sotatercept 投与動物）及び ADA（sotatercept 投与動物のみ）の評価を実施した。

被験物質と関連する計画外の死亡はみられず、自発運動、学習及び記憶（ビール型迷路）の検査、又は妊娠15日目の子宮内胚生存の指標（着床前胚損失率、着床後胚損失率、平均生存胚数、黄体数及び着床部位数）に変化は認められなかった。

投与期間中に全用量群で被験物質と関連する所見が認められた。主試験動物では、10 mg/kg Q1W 群で後肢の腫脹／機能障害の発現頻度の増加、1 mg/kg Q1W 以上の雄で体重及び摂餌量の減少、並びに1 mg/kg Q1W 以上の雄及び3 mg/kg Q1W 以上の雌で性成熟の遅延が認められた。FOB アッセイでは、3 mg/kg Q1W 以上の雄で後肢握力の低下が認められた。

主試験動物では、投与期間中に被験物質と関連する臨床病理学的検査値の変化として、概して1 mg/kg Q1W 以上の用量群で赤血球量を示すパラメータ（RBC、HGB、HCT、網状赤血球絶対数、RDW、HDW）の軽微な増加、MCH、MCHC、MCV あるいは血小板の軽微な減少、並びに10 mg/kg Q1W 群で MPV 及びフィブリノゲンのごく軽微な増加が認められた。血液生化学的検査値の変化として、1 mg/kg Q1W 以上の雌で ALP のごく軽微な増加、腎毒性を示唆する変化［1 mg/kg Q1W 以上の用量群における BUN の軽微な増加及びクロール（個体別）の軽微な減少、多くが3 mg/kg Q1W 以上の用量群におけるクレアチニンあるいはリンの増加、及びアルブミン、グロブリンあるいは総蛋白質の軽微な減少］が認められ、概して3 mg/kg Q1W 以上の用量群における尿中蛋白反応陽性所見の増加、10 mg/kg Q1W 群における尿比重の低下及び尿量の増加、並びに腎臓の病理組織学的所見と関連した。

主試験動物（サブセット1）の生後98日目の計画剖検時には、被験物質と関連する変化として、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で精巣及び精巣上体の剖検所見（軟化及び小型化）、並びに3 mg/kg Q1W 以上の用量群で腎臓の剖検所見（腎盂の拡張及び結節）が認められた。器官重量の変化として、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で心臓、精巣上体及び前立腺重量の減少、並びに卵巣重量の増加が認められた。3 mg/kg Q1W 以上の用量群で精巣重量の減少が認められた。

主試験動物では、生後98日目に脾臓の組織形態学的所見として、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で軽微から軽度の辺縁帯リンパ組織における細胞充実性の低下、軽微から中等度の赤脾髄における細胞充実性の増加が認められた。1 mg/kg Q1W 以上の用量群の腎臓では、軽微から中等度の慢性進行性腎症及び膜性増殖性糸球体腎炎、軽微から重度の髄質／腎乳頭尿細管の萎縮／低形成（間質の増加を伴う）、軽度の腎乳頭の壊死、軽微から中等度の尿細管及び腎盂の拡張、又は軽微から中等度の出血が認められた。1 mg/kg Q1W 以上の用量群で軽微な腺胃粘膜の鉱質沈着が認められた。1 mg/kg Q1W 以上の用量群で、軽微から軽度の門脈周囲肝細胞の空胞化の発現頻度が増加した。副腎皮質では、3 mg/kg Q1W 以上の用量群で軽度から重度の壊死がみられ、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で軽微から中等度の索状帯の肥大が認められた。1 mg/kg Q1W 以上の用量群で、中等度から重度の両側性の精細管変性及び管腔内の精子数減少、並びに軽微から軽度の精巣上体管腔内の細胞残屑が認められた。

主試験動物（サブセット2）では、回復期間中に被験物質と関連する死亡はみられず、確認された臨床症状は10 mg/kg Q1W 群で認められた後肢の機能障害あるいは後肢の腫脹のみであった。1 mg/kg Q1W 以上の雄では、回復期間を通して平均体重の減少が持続的に認められ、概して摂餌量の減少と関連した。投与期間中において FOB で認められた握力の変化は、回復期間中に回復した。

回復期間終了時には、被験物質と関連する血液学的検査値又は凝固検査値の変化は認められなかった。被験物質と関連する臨床病理学的検査値の変化は、3 mg/kg Q1W 以上の雄における BUN の増加、尿量の増加及び尿比重の低下、並びに3 mg/kg Q1W 群の雄1匹におけるクレアチニン及びリンの増加、並びにクロールの減少が認められたのみであり、関連する腎臓の変化に基づき被験物質の投与と関連する可能性があると考えられた。

回復期間中に、無処置（未交配）の雌と同居させた1 mg/kg Q1W 以上の雄において、平均交尾率、受胎率及び妊孕率の低下が認められた。未交配の雄と同居させた sotatercept を投与した雌において、性周期又は生殖機能パラメータに被験物質の投与と関連する変化は認められなかった。

回復期間終了時に、腎臓、精巣及び精巣上体の剖検所見が持続して認められた。卵巣及び前立腺の器官重量の変化は回復期間後の剖検時に回復し、10 mg/kg Q1W 群の雌では投与期間終了時にみられた心臓、精巣及び精巣上体重量の変化に加えて腎臓重量の増加が認められた。回復期間終了時に認められた組織形態学的変化は、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で副腎における軽微から中等度の索状帯／網状帯の萎縮及び腎臓における軽微から軽度の慢性間質性炎症が認められたこと、並びに脾臓辺縁帯の細胞充実性の低下、腎盂の拡張及び門脈周囲肝細胞の空胞化が回復したことを除き、概して投与期間終了時の剖検で認められた変化と同様であった。

投与期間終了時（雌は生後92日目以降の発情期中、雄は生後97日目）にホルモン分析のため採取した検体で、被験物質と関連する変化として3 mg/kg Q1W 以上の雌で FSH の軽微な減少、並びに10 mg/kg Q1W 群の雄で FSH 及びエストラジオールの軽微な減少のみが認められたが、これ

らは有害ではないと考えられた。雌で生後184日目、雄で生後232日目には、被験物質と関連するホルモンの変化は認められなかった。

投与期間終了時に、1 mg/kg Q1W 以上の雄及び10 mg/kg Q1W 群の雌の一部の個体で EPO 濃度の増加が認められたが、被験物質との関連は不明であった。雌で妊娠15日目、雄で生後233日目に、被験物質と関連する EPO の変化は認められなかった。

いずれの剖検時（投与期間終了時及び回復期間終了時）においても、大腿骨の測定値に変化は認められなかった。二重エネルギーX 線吸収測定法（ex-vivo）を用いたとき、投与期間終了時及び回復期間終了時に1 mg/kg Q1W 以上の用量群で骨の直径（面積）、BMD あるいは BMC（大腿骨全体及び部分領域）の軽微な変化が認められた。

本試験で得られた TK パラメータを[表 2.6.6-15]に示す。

表 2.6.6-15　皮下投与後の幼若ラット血清中 sotatercept の平均（±SE）TK パラメータ：生後 7 日目及び 91 日目（TT #[redacted]-7864）

		PND 7		PND 91	
Dose[a] (mg/kg Q1W)	Sex	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)	C_{max} (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg·hr/mL)
1	Male	4.82 ± 0.453	606 ± 22.9	22.0 ± 2.08	3270 ± 330
	Female	4.83 ± 0.0639	598 ± 15.1	20.2 ± 2.15	2900 ± 145
	Combined	4.83 ± 0.205	602 ± 13.3	21.1 ± 1.40	3080 ± 181
3	Male	16.4 ± 2.05	1730 ± 154	34.2 ± 7.02	5100 ± 1030
	Female	18.2 ± 2.54	1780 ± 152	33.8 ± 5.60	4940 ± 895
	Combined	16.0 ± 1.67	1760 ± 105	34.0 ± 4.30	5040 ± 632
10	Male	53.6 ± 5.75	6200 ± 422	81.3 ± 16.5	12,200 ± 761
	Female	55.5 ± 5.36	6540 ± 254	118 ± 26.9	16,000 ± 3120
	Combined	54.1 ± 4.03	6370 ± 243	93.1 ± 13.5	13,700 ± 1410

$AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification; C_{max}=observed maximum concentration; PND=postnatal day; Q1W=once weekly; SE=standard error; TK=toxicokinetic(s).

a Sotatercept concentrations in control samples were BLQ (0.04 µg/mL).

Sotatercept を Q1W で13週間投与したとき、用量範囲全体における sotatercept の曝露量は雄で1.97～5.40倍、雌で2.45～4.85倍に増加した。生後128日目に評価した TK 動物において ADA は検出されなかった。

主試験動物（サブセット1）における生後98日目の sotatercept 濃度は、TK 動物における生後91日目の投与168時間後の濃度と同程度であった。妊娠15日目、生後98日目及び233日目に評価した主試験動物（サブセット1及び2）では、4匹を除き ADA は検出されなかった。一部の時点では、循環血中 sotatercept 濃度の上昇により ADA の検出が妨害され、偽陰性となった可能性がある。

サブセット4の動物では、投与期間中及び回復期間中に TDAR 及びイムノフェノタイピング評価を実施した。投与期間中又は回復期間中に、KLH を投与したときの T 細胞依存性 IgM 又は IgG 抗体反応に対する被験物質と関連する影響は認められなかった。イムノフェノタイピング評価では、投与期間中に3 mg/kg Q1W 以上の雄でリンパ球数の増加が認められた（影響は NK 細胞又は T 細胞ではなく、B 細胞コンパートメントに反映された）。雌では、1 mg/kg Q1W 以上の用量群で NK 細胞の割合の用量依存的な低下傾向が認められ、10 mg/kg Q1W 群の雌でみられた NK 細胞絶対数の減少と関連した。回復期間中も10 mg/kg Q1W 群の雄でリンパ球数の増加が持続して認められたものの、雌における NK 細胞の変化は回復した。これらの軽微から軽度の変化（B 細胞が約2～3倍、総リンパ球及び NK 細胞が約2倍未満）は、KLH 投与後のリンパ球活性化の軽度の増加を反映しており、変化の程度が低く、大部分のリンパ球サブセットで回復傾向が認められたことから、有害ではないと考えられる。

結論として、回復性を示さなかった有害な病理検査所見、雌雄の性成熟の遅延及び雄の受胎率の低下に基づき、本試験の NOEL 及び NOAEL は1 mg/kg Q1W 未満であった（$AUC_{0\text{-}168h}$ は 3,080 µg·hr/mL）。

2.6.6.7 局所刺激性試験

局所刺激性は、ラット及びサルを用いた反復静脈内及び皮下投与試験の一環として評価した。いずれの投与経路においても、ラット及びサルでの sotatercept の忍容性は良好であった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性／免疫原性試験

反復投与毒性試験において、sotatercept の免疫原性に起因すると考えられる過敏症又はアナフィラキシーは認められなかった。ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験、並びに幼若ラットを用いた毒性試験において sotatercept の免疫原性（ADA）を評価した。Sotatercept は反復投与後に ADA 反応を誘導したが、この反応は動物で多くのバイオ医薬品に認められるものである。

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

文献の in vitro 及び in vivo データに基づくと、アクチビンは免疫応答の調節に関与することが知られている。その応答は細胞型間で異なり、細胞の成熟度及び活性化状態、並びに免疫応答の空間的及び時間的背景に応じて異なる[4.3: 085GRQ]。アクチビン A は、マクロファージにおいてその活性化状態に応じて炎症促進性又は抗炎症性反応のいずれかを調節する[4.3: 085GRX][4.3: 085GRQ]。さらに、アクチビン A が B 細胞による抗体産生を刺激し、制御性 T 細胞の発生にも影響することが示唆されている[4.3: 085GRX][4.3: 085GRQ]。一方、GDF-8、GDF-11及び BMP-10

が免疫機能に及ぼす潜在的な影響については十分に報告されていない[4.3: 085GRX]。Sotatercept は循環血中のアクチビン濃度を調節する一方で、標的細胞受容体における残存リガンドによるシグナル伝達を阻害することはなく、オートクリン及びパラクリンによるアクチビンシグナル伝達に干渉する可能性も低い。

免疫機能を調節する可能性を示唆する文献がある一方で、sotatercept が免疫機能に影響するという決定的なエビデンスはない。Sotatercept のサルを用いた試験の1つ（TT #[redacted]-7826）では、多くの動物でマラリア原虫感染が認められ、かつ1匹が劇症マラリアによって早期に死亡したことから、試験を早期に中止した。マラリア原虫は試験開始前に存在していたが、9週間の投与期間を通してその発現頻度及び重症度は増加した。Sotatercept を介した免疫機能の変化がこれらの動物の感受性を高めた可能性はあるものの、赤血球生成促進剤により潜在的な宿主細胞集団が増加し、マラリア原虫感染が亢進する可能性があることは広く認識されている[4.3: 084XWP]。そのため、sotatercept を介した免疫機能の変化ではなく、sotatercept を介した赤血球及び網状赤血球の増加によりマラリア原虫感染に対する試験動物の感受性が高まったと考えられる。

完了した sotatercept の非臨床試験のうち、サルを用いた27週間投与試験（TT #[redacted]-7812）の 10 mg/kg Q2W 以上の用量群の胸腺及び9ヵ月間投与試験（TT #[redacted]-7938）の2.6 mg/kg Q4W 以上の用量群の脾臓において、軽微から中等度のリンパ球の枯渇が認められた。しかし、評価した全用量群のサル及び成熟ラットにおいて、胸腺又は脾臓の変性又は壊死を示す所見、その他のリンパ組織における有害な所見、循環血中白血球の意味のある変化、及び血清中グロブリン濃度の変化はみられなかった。サル及び幼若ラットで認められた骨髄における骨髄球系／赤芽球系細胞比の軽微な変化は、薬理学的作用を介した軽度の赤血球パラメータの増加と一致しており、有害な循環血中白血球の変化を伴っていなかった。幼若ラットで認められたリンパ系の変化は、概して脾臓の白脾髄の辺縁帯における軽微から軽度の細胞充実性の低下、あるいは赤脾髄における軽微から軽度の細胞充実性の増加のみであった。幼若ラットを用いた重要な試験において、TDAR アッセイでは sotatercept と関連する変化は認められず、イムノフェノタイピング検査では免疫抑制を示唆する所見はみられなかった。最後に、いずれの sotatercept の非臨床試験においても、過形成を示す強いシグナル及び腫瘍形成に係わるエビデンスは認められなかった。以上より、非臨床試験の結果を総じて、sotatercept には毒性学的に意味のある免疫調節作用はないことが示唆される。

2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験

作用機序を副次的薬理試験の一環として評価した。その他の毒性発現の機序に関する試験は実施しなかった。

2.6.6.8.4 依存性試験

Sotatercept はアミノ酸配列に基づき算出したホモ二量体としての分子量が78 kDa のタンパク質であり、血液脳関門を通過しない。薬物乱用傾向を示唆する sotatercept の薬理学的プロファイルはみられなかった。さらに、反復投与毒性試験において向精神作用（すなわち鎮静又は興奮作用）を示唆する神経学的検査所見又は臨床症状は認められなかった。したがって、薬物乱用に関する動物を用いた試験は実施しておらず、乱用傾向を示す可能性は極めて低いと考えられる。

2.6.6.8.5 代謝物に関する試験

Sotatercept は天然に存在するアミノ酸のみで構成されるタンパク質であり、通常のタンパク質分解経路を介した異化作用を受けると予想される。Sotatercept の代謝物の潜在的な毒性を、反復投与毒性試験の一環として評価した。その他の代謝物に関する試験は実施しなかった。

2.6.6.8.6 不純物に関する試験

いずれの不純物についても非臨床試験は実施しなかった。原薬中の不純物は、sotatercept の様々なバッチ／ロットを用いて実施した毒性試験において、その特定されたレベルでの安全性を評価した（[2.6.7.4 項]参照）。

2.6.6.8.7 その他の試験

2.6.6.8.7.1 光毒性試験

ICH S10ガイドライン（医薬品の光安全性評価ガイドラインについて）に記載のとおり、本ガイドラインは「一般的に、ペプチド、蛋白質、抗体薬物複合体あるいはオリゴヌクレオチドに適用されない」ことから、sotatercept のようなタンパク質製剤の光毒性評価を実施する必要はないと考えられる。この根拠に基づき、sotatercept の非臨床光毒性試験は実施しておらず、実施する予定はない。

2.6.6.8.7.2 マウスを用いた RAP-011の1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間腹腔内投与毒性試験（TT #[redacted]-7811）

[4.2.3.7.7.1: TT[redacted]7811]

本 GLP 適用試験は、sotatercept と同様の融合タンパク質である RAP-011を用いて、CD-1マウスを用いた探索的毒性試験として実施した[2.6.7.17 項]。RAP-011はヒト Fc（IgG1）の代わりにマウス Fc（IgG2a）を含有する。本探索的試験の目的は、被験物質に対する抗体反応を起こさないと予測されるげっ歯類において、反復腹腔内投与したときの標的器官毒性を明らかにすることであった。

試験開始時に9～11週齢の ICR（CD-1）マウスに、RAP-011を週2回（TW）腹腔内投与した。媒体（PBS）で調製した RAP-011を0（媒体）、10、30又は50 mg/kg の用量において TW で3ヵ月間投与した。いずれの投与物質も投与容量は5～5.8 mL/kg とした。各群に雌雄各20匹を割り付けた。各群において最初の雌雄各10匹を試験92日目の剖検に割り付け、残りの雌雄各10匹を試験120日目（1ヵ月間の回復期間後）の剖検に割り付けた。

動物の評価は、死亡、症状観察、体重、体重変化、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査及び病理学的検査に基づき実施した。

被験物質と関連する死亡は主に30 mg/kg TW 以上の用量群で認められた。計画外の死亡は、瀕死状態で安楽殺した又は死亡が確認された投与動物計34匹（試験60日目前後から、10 mg/kg TW 群、30 mg/kg TW 群及び50 mg/kg TW 群でそれぞれ40匹中2匹、40匹中15匹及び40匹中17匹）でみられた。病的状態が続いたため、50 mg/kg TW 群の生存した雌動物は試験74日目に試験を終了し、50 mg/kg TW 群の全ての生存した雄動物（回復期間の評価に割り付けた動物を含む）は試験92日目（投与期間終了時）に試験を終了した。剖検では胸腔内に赤色液貯留が認められた。

全用量群の計画外の死亡動物及び生存動物において、臨床症状として呼吸促迫及び被毛粗剛が認められた。

全用量群の雌雄で、被験物質と関連する軽微で一過性の平均体重／体重変化量の増加及び減少が認められ、ときにこれらのパラメータの増加は摂餌量の増加と関連した。

全ての RAP-011投与群で、赤血球パラメータ（RBC、RDW、HGB 及び HCT 並びに網状赤血球数）の増加が認められた。ナトリウム及びトリグリセリドの増加を伴う肝酵素（AST 及び ALT）の軽度かつ可逆的な用量依存性の増加が認められたが、いずれも試験120日目（回復期間終了時）までに回復した。

試験92日目の計画剖検では、全用量群において頻繁に血胸を示唆する胸腔内の赤色液貯留が認められた。本所見の発現頻度は、試験120日目に剖検した動物では低下した。

投与期間終了時（試験92日目）及び回復期間終了時（試験120日目）に、雌雄で平均心臓重量及び腎臓重量の減少が認められた。

病理組織学的所見は全用量群で類似しており、脳、腎臓、脾臓及び胸腺に認められ、程度は低いものの心臓及び肺にも認められた。所見として、脈絡叢の軽微な多巣性の鉱質沈着、腎皮質における尿細管上皮細胞の軽微から軽度の多巣性かつ両側性の変性／壊死、軽微な多巣性の肺胞組織球症及び軽微から中等度の心室心筋の変性／壊死が認められた。また、脾臓において軽度から中等度の造血亢進が認められた。リンパ器官（脾臓、胸腺及びリンパ節）におけるリンパ球の枯渇は、マウスの衰弱状態に起因するものであると考えられた。

要約すると、RAP-011を10、30又は50 mg/kg TW の用量で腹腔内投与したとき、30 mg/kg TW 以上の用量群で過剰な毒性／死亡が認められた。10 mg/kg TW 以上の用量の投与により、薬理学的作用を介した赤血球パラメータの増加、脾臓における造血亢進、心臓及び腎臓重量の減少並び

に脳脈絡叢の病理組織学的所見が認められた。明らかな毒性を示す用量においては、RAP-011による腎皮質における尿細管内の病変、肺胞組織球症及び心室心筋の変性／壊死も認められた。

2.6.6.8.7.3 雌 Sprague-Dawley ラットの5/6腎摘除モデル又は片側尿管結紮モデルを用いた sotatercept、[redacted]、RAP-011及び[redacted]の腎毒性試験（TT #[redacted]-7865）

[4.2.3.7.7.2: TT[redacted]7865]

本試験の目的は、2種類のげっ歯類腎不全モデル（5/6腎摘除及び UUL）を用いて、sotatercept及びそのマウスアナログである RAP-011、並びに[redacted]及びそのマウスアナログである[redacted]の影響を評価することであった。Sotatercept 及び RAP-011の結果のみを以下に要約する[2.6.7.17 項]。

本試験では腎不全モデルとして5/6腎摘除モデル及び UUL モデルを用いた。本試験ではモデルごとに2つのアームに分けて各モデルを検討した。それぞれのアームに7つの投与群を設け、各群実手術動物6匹及びシャム手術動物3匹に Q1W で13週間皮下投与した。Sotatercept（[redacted]を含む注射用滅菌水で調製、[redacted]）は、5/6腎摘除試験アーム（グループ2及び3）及び UUL 試験アーム（グループ9及び10）の動物に1又は10 mg/kg Q1W の用量で皮下投与した。RAP-011（PBS で調製、pH 7.2）は、5/6腎摘除試験アーム（グループ6）及び UUL 試験アーム（グループ13）の動物に10 mg/kg Q1W の用量で皮下投与した。媒体対照（10 mM トリス緩衝生理食塩水、pH 7.2）は5/6腎摘除術試験アーム（グループ1）及び UUL 試験アーム（グループ8）の動物に投与した。5/6腎摘除術は試験3週目に、UUL 術は試験11週目に実施した。初回投与時にラットは約9週齢であった。本試験は GLP 非適用下で標準操作手順書に従い実施した。

評価は、死亡、症状観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血清クレアチニン及び尿素窒素、尿パラメータ（クレアチニン、尿量、並びにバイオマーカーのアルブミン、TIM-1、リポカリン-2及びオステオポンチン）、並びに腎臓の組織形態学的検査に基づき実施した。標的遺伝子12種及び miRNA 転写産物8種の腎発現データを評価した。Sotatercept の濃度を測定し、sotatercept 及び RAP-011を投与した動物における ADA を測定した。

被験物質と関連する死亡はみられず、体重、摂餌量、血清クレアチニン及び尿素窒素、又は尿中クレアチニン及び尿量のパラメータの変化は認められなかった。被験物質と関連する腎臓の遺伝子／miRNA 発現の変化は認められなかった。

被験物質と関連する四肢の腫脹が sotatercept（1 mg/kg Q1W）を投与した1匹にみられ、薬理学的作用を介した軽度の赤血球量（RBC、HGB 及び HCT）の増加が、5/6腎摘除ラットの sotatercept 及び RAP-011を投与した全用量群、並びに UUL ラットの sotatercept 及び RAP-011の 10 mg/kg Q1W 群で認められた。

被験物質と関連する腎臓の尿中バイオマーカーであるアルブミン、TIM-1、リポカリン-2及びオステオポンチンの増加が、5/6腎摘除動物の大部分の sotatercept 及び RAP-011投与群に認められた。Sotatercept 及び RAP-011を投与した UUL 動物では、リポカリン-2の軽微な増加が認められた。

腎摘除動物の媒体対照群、又はシャム手術動物の ACE 及び RAP 投与群と比較したとき、腎摘除動物の sotatercept 又は RAP-011投与群では、糸球体における同様の変化がみられたものの平均重症度が顕著に増加した。Sotatercept 及び RAP-011投与群におけるその他の所見として、糸球体の変化（硝子質沈着、上皮性半月体の形成、ボウマン嚢の肥厚、ボウマン腔の拡張あるいは糸球体の萎縮）、尿細管間質の病変（尿細管の拡張あるいは好塩基性変化、間質の線維増殖／線維化あるいは単核炎症性細胞浸潤）の発現頻度あるいは程度の増加、並びに糸球体及び尿細管間質のリン酸化 Smad2（pSmad2）及び αSMA 免疫染色像の増加が認められた。

試験の UUL アームにおける尿管閉塞を伴う腎臓の組織形態学的変化は、閉塞性腎症に特徴的なものであり、閉塞性腎症の程度は媒体、sotatercept 及び RAP-011投与群間で顕著な差は認められなかった。

試験92日目に、sotatercept 投与動物の58%、RAP-011投与動物の11%が ADA 陽性であった。ADA 陰性動物では、最終投与後に測定した血清中薬物濃度は初回投与後に測定した濃度の2倍から10倍であり、薬物の蓄積が示唆された。一方、多くの ADA 陽性動物では、試験期間を通して薬物濃度が低下した。

結論として、5/6腎摘除動物に sotatercept 及び RAP-011を Q1W で皮下投与したとき、腎摘除動物の媒体対照群又はシャム手術動物の sotatercept 及び RAP-011投与群と比較して、糸球体及び尿細管間質の病変が顕著に増悪し、pSmad2及び αSMA の免疫染色像の増加、並びに尿中のアルブミン、TIM-1、リポカリン-2あるいはオステオポンチン濃度の増加が認められた。片側尿管閉塞に関連して腎臓における形態学的変化が進行した状態にあったため、閉塞した腎臓においてsotatercept 及び RAP-011の投与による組織形態学的な影響を評価することはできなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

Sotatercept は、ActRIIA リガンドであるアクチビン A 及び B、GDF-11（別名 BMP-11）、並びにGDF-8（別名ミオスタチン）に対する高親和性のリガンド捕捉剤であり、BMP-10、BMP-9及びBMP-6に対する親和性ははるかに低い。Sotatercept は WHO 分類第1群である PAH の治療を目的としている。MRHD は21日間隔の0.7 mg/kg 皮下投与であり、第 III 相試験の PAH 患者における sotatercept 曝露量（母集団薬物動態解析により推定）に基づくと、MRHD での定常状態の $AUC_{0\text{-}504h}$ は4,110.24 μg·hr/mL、C_{max} は9.67 μg/mL となる。非臨床リスクアセスメント及び曝露量比の決定は、MRHD での臨床曝露量に基づいている。

ラットを用いた最長3ヵ月間及びサルを用いた最長9ヵ月間の反復投与毒性試験、並びにラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験において sotatercept の安全性を評価した。Sotatercept のが

ん原性については、ICH S6（R1）ガイドラインに従い WOE に基づくリスク評価を実施した。重要な試験はいずれも GLP を遵守し、ICH ガイドラインに従って実施した。重要な試験で設定した用量の妥当性はいずれも、試験内又は同一用量において同一条件下で実施した試験における sotatercept の TK 評価により支持された。

ラット及びサルの反復投与試験は、sotatercept の毒性プロファイルを網羅的に評価するため、十分に高い全身曝露量で実施した。ラットを用いた3ヵ月間投与毒性試験、並びにサルを用いた27週間及び9ヵ月間投与毒性試験において、ラットで最大75,900 µg·hr/mL、並びにサルでそれぞれ最大247,559 µg·hr/mL 及び51,833 µg·hr/mL の曝露量（$AUC_{0\text{-}504h}$）で sotatercept の評価を実施した。評価した動物における曝露量比は、MRHD での臨床曝露量（4,110.24 µg·hr/mL）と比較してラットで18倍、サルで最大60倍であった。サルを用いた27週間投与毒性試験では、sotatercept を 30 mg/kg Q2W 以上の用量で投与したとき、曝露量（$AUC_{0\text{-}504h}$）は131,384 µg·hr/mL 以上（MRHD での臨床曝露量の32倍以上）であり、用量制限毒性（腎不全に一致する臨床症状及び病理組織学的所見）が認められた。重要なラットを用いた3ヵ月間投与試験及びサルを用いた9ヵ月間投与試験における NOAEL は、それぞれ 3 mg/kg Q1W （6,270 µg·hr/mL） 及び 1 mg/kg Q4W（4,523 µg·hr/mL）であった。これらの NOAEL における安全域は MRHD での臨床曝露量の2倍及び1倍である。

重要な試験における NOAEL に基づく安全域を[表 2.6.6-16]に要約する。サル及びラットにおいて sotatercept の曝露量に性差はなかったことから、曝露量比は雌雄を合算した TK データに基づいている。

表 2.6.6-16　Sotatercept の定常状態における全身曝露量及び曝露量比の概要

Daily Dose	C_{max} (µg/mL)	AUC[a] (µg·hr/mL)	$AUC_{0\text{-}504h}$[b] (µg·hr/mL)	Exposure Margin to Clinical $AUC_{0\text{-}504h}$ at 0.7 mg/kg[c]
3-Month SC Toxicity Study in Rats with a 1-Month Recovery (TT #[redacted]-7823)				
Dosages were 0.3, 3, and 30 mg/kg Q1W. Sampling was insufficient to determine C_{max} or AUC (only trough concentrations were determined). Exposure margins for this study were calculated using data from TT #[redacted]-7833.				
3-Month SC TK Study in Rats with a 1-Month Recovery (TT #[redacted]-7833)				
Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}168h}$[d] Note: Values are presented as sex-combined mean (male mean/female mean). For the sparse TK data, composite sex-combined, male, and female C_{max} values might be observed at different timepoints resulting in the sex-combined C_{max} being smaller than both male and female C_{max} values.				
0.3 mg/kg Q1W	3.94 (4.39/4.15)	610 (654/564)	1830 (1962/1692)	0.4-fold (0.5/0.4-fold)
3 mg/kg Q1W (NOAEL)	14.2 (20.3/9.32)	2090 (2960/1220)	6270 (8880/3660)	2-fold (2/0.9-fold)
30 mg/kg Q1W	162 (188/168)	25,300 (28,000/22,600)	75,900 (84,000/67,800)	18-fold (20/16-fold)

Daily Dose	C_{max} (µg/mL)	AUC[a] (µg·hr/mL)	$AUC_{0\text{-}504h}$[b] (µg·hr/mL)	Exposure Margin to Clinical $AUC_{0\text{-}504h}$ at 0.7 mg/kg[c]
3-Month SC Toxicity Study in Monkeys with a 2-Month Recovery (TT #[redacted]-7824) Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}312h}$[e]				
10 mg/kg Q2W	142	32,139	52,065	13-fold
30 mg/kg Q2W (NOAEL)	351	82,389	133,470	32-fold
50 mg/kg Q2W	530	107,155	173,591	42-fold
27-Week SC Toxicity Study in Monkeys with a 13-Week Recovery (TT #[redacted]-7812) Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}336h}$[f]				
10 mg/kg Q2W (NOAEL <10 mg/kg)	187	29,336	44,004	11-fold
30 mg/kg Q2W	443	87,589	131,384	32-fold
50 mg/kg Q2W	1404	165,039	247,559	60-fold
9-Month SC Toxicity Study in Monkeys with a 3-Month Recovery (TT #[redacted]-7938) Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}672h}$ for the 1, 2.6, and 10 mg/kg Q4W dose groups and $AUC_{0\text{-}336h}$ for the 10 mg/kg Q2W dose group[g] Note: Study Week 37/39 values are presented as sex-combined mean (male mean/female mean).				
1 mg/kg Q4W (NOAEL)	21.4 (25.2/17.7)	6030 (6462/5597)	4523 (4847/4198)	1-fold (1/1-fold)
2.6 mg/kg Q4W	51.2 (41.6/62.8)	11,729 (11,087/12,499)	8797 (8315/9374)	2-fold (2/2-fold)
10 mg/kg Q4W	126.7 (124.4/128.6)	30,776 (31,684/30,020)	23,082 (23,763/22,515)	6-fold (6/5-fold)
10 mg/kg Q2W	164.4 (166.7/162.1)	34,555 (37,053/32,058)	51,833 (55,580/48,087)	13-fold (14/12-fold)
Fertility SC Study in Male Rats (TT #[redacted]-7840) Male systemic exposure data are from TT #[redacted]-7833 (3-Month SC TK Study in Rats with 1-Month Recovery) and are expressed as $AUC_{0\text{-}168h}$[d]				
0.3 mg/kg Q1W	4.39	654	1962	0.5-fold
3 mg/kg Q1W (Reproductive NOAEL)	20.3	2960	8880	2-fold
30 mg/kg Q1W	188	28,000	84,000	20-fold
Fertility and Early Embryonic Development SC Study in Female Rats (TT #[redacted]-7863)[h] Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}168h}$[d]				
5 mg/kg Q1W (Developmental NOAEL)	24.8	2735	8205	2-fold
15 mg/kg Q1W (Maternal NOAEL)	108	12,300	36,900	9-fold
50 mg/kg Q1W	268	28,761	86,283	21-fold
Embryo Fetal Developmental SC Toxicity Study in Rats (TT #[redacted]-7913) Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}168h}$[d]				
5 mg/kg Q1W (Developmental NOAEL)	NA	2642	7926	2-fold
15 mg/kg Q1W	NA	5088	15,264	4-fold
50 mg/kg Q1W (Maternal NOAEL)	NA	19,885	59,655	15-fold

Daily Dose	C_{max} (µg/mL)	AUC[a] (µg·hr/mL)	$AUC_{0\text{-}504h}$[b] (µg·hr/mL)	Exposure Margin to Clinical $AUC_{0\text{-}504h}$ at 0.7 mg/kg[c]
Embryo Fetal Developmental SC Toxicity Study in Rabbits (TT #[redacted]-7841) Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}366h}$[f]				
0.5 mg/kg Q1W (Developmental NOAEL)	6.89	1070	1477	0.4-fold
1.5 mg/kg Q1W	17.6	1780	2456	0.6-fold
5 mg/kg Q1W (Maternal NOAEL)	61.5	10,900	15,042	4-fold
Pre and Postnatal Development and Reproductive SC Toxicity Study in Rats (TT #[redacted]-7830) Pregnant female systemic exposure data are from TT #[redacted]-7913 (Embryo Fetal Developmental SC Toxicity Study in Rats) and are expressed as $AUC_{0\text{-}168h}$[d]				
1.5 mg/kg[i] (Lactation NOAEL)	NA	801	2403	0.6-fold
5 mg/kg (Gestation NOAEL)	NA	2642	7926	2-fold
10 mg/kg[j]	NA	5284	15,852	4-fold
13-Week SC Toxicity Study of Sotatercept in Juvenile Rats with an 18-Week Recovery (TT #[redacted]-7864) Systemic exposure expressed as $AUC_{0\text{-}168h}$[d]				
1 mg/kg Q1W (NOAEL <1 mg/kg)	21.1	3080	9240	2-fold
3 mg/kg Q1W	34.0	5040	15,120	4-fold
10 mg/kg Q1W	93.1	13,700	41,100	10-fold

AUC=area under the concentration-time curve; $AUC_{0\text{-}Xh}$=area under the concentration-time curve from time 0 to X hours; C_{max}=observed maximum concentration; NA=not applicable; NOAEL=no observed adverse effect level; Q1W=once weekly; Q2W=once every two weeks; Q4W=once every four weeks; SC=subcutaneous(ly); TK=toxicokinetic(s).

a The dosing interval varied across nonclinical studies and is indicated in the header for each individual study.

b The nonclinical exposure was extrapolated to $AUC_{0\text{-}504h}$.

c The clinical systemic exposure ($AUC_{0\text{-}504h}$) at 0.7 mg/kg administered once every 21 days is 4110.24 µg·hr/mL (171.26 µg·day/mL, see [2.7.2 項]).

d $AUC_{0\text{-}504h}$ was determined by multiplying the AUC by 3.

e $AUC_{0\text{-}504h}$ was determined by multiplying the AUC by 1.62.

f $AUC_{0\text{-}504h}$ was determined by multiplying the AUC by 1.38 for TT #[redacted]-7841 and by multiplying the AUC by 1.5 for TT #[redacted]-7812.

g $AUC_{0\text{-}504h}$ was determined for the 1, 2.6, and 10 mg/kg Q4W dose groups by multiplying the AUC by 0.75, and for the 10 mg/kg Q2W group by multiplying the AUC by 1.5.

h Presented $AUC_{0\text{-}168h}$ and C_{max} data, and associated $AUC_{0\text{-}504h}$ and exposure margins are from the 1st dose. $AUC_{0\text{-}168h}$ values after the 3rd dose were calculated incorrectly in the study TK report (see Note to File for TT #[redacted]-7863).

i No measured exposure in pregnant rats dosed at 1.5 mg/kg; therefore, the exposure in pregnant rats at 5 mg/kg of 2642 µg·hr/mL was divided by 3.3.

j No measured exposure in pregnant rats dosed at 10 mg/kg; therefore, the exposure in pregnant rats at 5 mg/kg of 2642 µg·hr/mL was multiplied by 2.

Sotatercept の反復投与毒性試験において、血液、心臓、副腎及び精巣輸出管／精巣に認められた影響の大部分は、ActRIIA シグナルの阻害という予測された薬力学的作用に起因するものと考えられる。

ラット及びサルを用いた全ての反復投与毒性試験の多くの用量で、sotatercept による有害ではない赤血球パラメータの軽微な増加が認められ、これはアクチビン A 及び GDF-11の阻害に関連したものである[4.3: 084N7D]。赤血球パラメータの増加は、最長3ヵ月間の回復期間後にいずれも回復傾向を示した。循環血中の白血球パラメータは、概して対照値と同程度であった。ラット

を用いた3ヵ月間投与試験及びサルを用いた9ヵ月間投与試験で得られた有害ではない赤血球系の変化に対する NOAEL（ラットで30 mg/kg Q1W 以上、$AUC_{0\text{-}504h}$ は75,900 μg·hr/mL 以上及びサルで10 mg/kg Q2W 以上、$AUC_{0\text{-}504h}$ は51,833 μg·hr/mL 以上）において、動物の全身曝露量は MRHD での臨床曝露量の13倍から18倍以上であった。

ラットでのみ、sotatercept の投与による心臓重量の減少が認められたが、関連する病理組織学的所見はみられなかった。心臓重量の減少は、急速に成長している思春期のラットを用いた3ヵ月間皮下投与試験及び4週間静脈内投与試験で認められたが、1ヵ月間の回復期間後に回復又は回復傾向を示し、有害ではないと考えられた。マウスに RAP-011（sotatercept のマウスの相同分子）を投与したとき、検討した全ての用量群で心臓重量の減少が認められ、関連する心筋変性が主に明らかな毒性用量において認められた。急速に成長しているラットでみられた所見に対して、サルでは被験物質と関連する同様の心臓への影響は認められず、心電図パラメータ又は血圧に変化はみられなかった。心筋の発生及び成長に重要な BMP-10シグナル伝達の調節が、げっ歯類における心臓重量の変化に関与していると考えられる[4.3: 084XWB]。ラットにおける心臓重量の減少に対する NOAEL は30 mg/kg Q1W 以上（$AUC_{0\text{-}504h}$ は75,900 μg·hr/mL 以上）であり、曝露量は MRHD での臨床曝露量の18倍以上である。

副腎の変化も、急速に成長する思春期のラットにのみ認められた。副腎の変化の程度は用量依存的に増加し、概して副腎重量の増加、皮質の限局性又はびまん性の軽度のうっ血（有害ではない）、副腎皮質の多巣性鉱質沈着（有害）、あるいは有害な皮質及び髄質の壊死がみられ、変色／病巣を伴う副腎の肥大といった剖検所見と関連していた。幼若動物毒性試験では、非常に若齢のラットの副腎に同様の所見（肥大及び壊死）が認められた。

非常に若齢及び思春期のラットで認められた副腎毒性は、成熟期早期のラットで生じるアクチビン依存性の副腎リモデリングにおける異常に一致していた[4.3: 080SJ4]。ヒト以外の霊長類においてもアクチビン依存性の副腎の発生／リモデリングが生じるが、基本的に生後1年以内に完了すると考えられている[4.3: 085JLW]。Sotatercept の毒性試験プログラムで用いた最も若齢のカニクイザルは試験開始時に約3歳であったことから、副腎のリモデリングは投与開始前に完了していたと予測される。副腎の成熟時期の種差により、急速に成長しているラットと幼若サルとの間で sotatercept に起因する副腎毒性に対する感受性が異なると推察される。ヒトにおいても副腎のリモデリングが起こり、またアクチビン A は in vitro で胎児の副腎細胞の増殖及びステロイド産生に影響するものの、成人のそれには影響しない[4.3: 085JLS]。ヒトにおける副腎のリモデリング及びアクチビンを介したアポトーシスの影響を受けやすい胎児層の喪失は、生後3～6週の間に生じる[4.3: 080SHR][4.3: 085JLZ]。したがって、高年齢の小児及び成人は、sotatercept に起因する副腎毒性に対する感受性を示さないことが示唆される。Sotatercept の臨床試験において、副腎機能不全を示唆する有害事象はこれまでに認められていない。急速に成長している思春期ラットの副腎に対する NOAEL（3 mg/kg Q1W、$AUC_{0\text{-}504h}$ は6,270 μg·hr/mL）において、sotatercept の全身曝露量は MRHD での臨床曝露量の2倍であった。非常に若齢の（幼若）ラットを用いた重要な

試験における NOAEL は最低用量未満（1 mg/kg Q1W 未満、$AUC_{0\text{-}504h}$ は9,240 µg·hr/mL 未満）であり、sotatercept の曝露量は MRHD での臨床曝露量の2倍未満であった。

Sotatercept の投与により雄ラットの精巣輸出管／精巣毒性が認められた。ラットを用いた3ヵ月間反復投与毒性試験（精巣輸出管の検査は実施しなかった）及び雄受胎能試験（精巣輸出管の病理組織学的評価を含む）において、sotatercept による精巣の片側性又は両側性の退行性変化及びやや重度の精子肉芽腫／うっ滞が認められ、精巣輸出管レベルでの流出路閉塞による二次的なものと考えられた。雄受胎能試験では、これらの精巣輸出管及び精巣の組織形態学的変化は13週間の回復期間後に完全には回復しなかったことから、0.3 mg/kg Q1W 以上の用量で有害であると考えられた。精巣輸出管／精巣毒性の NOAEL は0.3 mg/kg Q1W 未満（$AUC_{0\text{-}504h}$ は1,962 µg·hr/mL 未満）であり、曝露量は MRHD での臨床曝露量未満であった。関連する雄受胎能パラメータに対する有害な影響は高用量（30 mg/kg Q1W）群のみで認められたが、これは本用量群において精巣への影響が両側性に高い発現頻度で出現したためと考えられる。サルでは同様の精巣に対する影響は認められなかったものの、sotatercept の非臨床開発プログラムに用いたサルの多くは性成熟していなかったため、これらの動物のデータからは精巣輸出管／精巣毒性に対する感受性の種差について情報は得られない。

Sotatercept を投与したラットの精巣の所見は、発現頻度が低く、さらにこれらの影響が主に片側性であったことを含め、精巣輸出管の閉塞あるいは精巣網での正常な体液の再吸収の阻害[4.3: 085GRL]、精巣の精細管内腔の有害な背圧上昇、並びに圧力変化に関連する二次的な精巣の萎縮と一致している[4.3: 085GRJ][4.3: 085GSF][4.3: 043WCW][4.3: 085GRV][4.3: 085MQ9][4.3: 085GS4][4.3: 085GS8]。フォリスタチンの過剰発現により精巣輸出管における ActIIRA リガンド活性が低下したマウスにおいても、同様の精巣輸出管／精巣所見が認められた[4.3: 085GS4]。一方で、精巣に対する直接的な毒性作用は通常両側性にみられると考えられる。ラットの精巣輸出管は長く、精巣上体に入る単一の管に吻合するが[4.3: 085GRJ][4.3: 085GSC]、ヒトの精巣輸出管ははるかに短く、単一の管に吻合することはなく複数の管により精巣上体に入る[4.3: 085GRV][4.3: 085GS3]。このためヒトでは、複数の精巣輸出管の閉塞又は体液の再吸収の阻害にかかわらず、体液の流出が生じる。以上のデータから、精巣輸出管の構造に解剖学的な相違があるため、ヒトにおいて精巣に対する影響がみられる可能性は低いことが強く示唆される。

有害な糸球体の変化（糸球体腎炎）及び尿細管の変化（尿細管間質性腎炎）が、30 mg/kg Q1W 群のラット（NOAEL は 3 mg/kg Q1W、$AUC_{0\text{-}504h}$ は 6,270 µg·hr/mL）及び10 mg/kg Q4W 以上の用量群のサル（NOAEL は2.6 mg/kg Q4W、$AUC_{0\text{-}504h}$ は8,797 µg·hr/mL）で認められた。サルでは腎臓の所見は部分的に回復した。3ヵ月間の回復期間後にサルの腎臓で認められた変化は、10 mg/kg Q2W 群の1匹における軽微な間質性腎炎及び2.6 mg/kg Q4W 以上の用量群で孤発的にみられた小型の糸球体係蹄の発現頻度増加のみであった。ラットでは、30 mg/kg Q1W 群で認められた腎臓の変化は、1ヵ月間の回復期間後においても回復しなかった。

腎臓の変化に対する NOAEL におけるラット及びサルの sotatercept の全身曝露量は、MRHD での臨床曝露量の2倍であった。

サルでのみ、1 mg/kg Q4W 以上（$AUC_{0\text{-}504h}$ は4,523 μg·hr/mL 以上）の用量群で脈絡叢における小、細動脈の軽微な内膜肥厚を伴う単核細胞浸潤あるいは泡沫状マクロファージ浸潤が認められた。関連する脳の変化、臨床症状又は神経学的検査のエンドポイントの変化が認められなかったことから、脈絡叢の病理組織学的変化は有害ではないと考えられた。脈絡叢の変化に対する NOAEL（10 mg/kg Q2W、$AUC_{0\text{-}504h}$ は51,833 μg·hr/mL）における全身曝露量は MRHD での臨床曝露量の13倍であった。

腎臓及び脈絡叢の所見の時間経過及び組織像から、これらの変化に抗 sotatercept 抗体及び免疫複合体の沈着が関与している可能性が示唆された。しかし、その後の IHC 及び TEM 分析では、サルの腎臓及び脈絡叢組織に認められた IgG、IgM あるいは C3含有沈着物内に sotatercept が含まれているという確証は得られなかった。また、腎臓及び脈絡叢の変化と、変化がみられた動物における ADA の存在との間に明らかな関連性は認められなかった。総合すると、これらのデータは、腎臓及び脈絡叢で認められた毒性が sotatercept の直接的な影響によるものであることを示唆している。

Sotatercept の臨床試験では腎機能を綿密にモニタリングしているが、これまでにヒトにおける sotatercept の投与と腎機能障害との関連は確認されていない。同様に、脳／脈絡叢に対する影響を示唆する臨床での sotatercept と関連する CNS 所見は認められていない。

Sotatercept のがん原性試験は実施していない。Sotatercept はげっ歯類において免疫原性があり、ADA は sotatercept の曝露量及びげっ歯類を用いた長期試験で得られたデータの解釈に対して悪影響を及ぼすと予測される。また、sotatercept に起因する腎毒性は、加齢に伴う進行性腎症と関連して、ラットを用いた長期試験の生存及び解釈に対して悪影響を及ぼすと考えられる。ICH S6（R1）ガイドラインに従い、sotatercept のがん原性については WOE に基づくリスク評価を実施した。Sotatercept の非臨床プロファイル及び文献データは、本生物学的分子が遺伝毒性を示さず、PAH の動物モデルにおいて増殖抑制活性及び線維化抑制作用を示し、ホルモンに悪影響を及ぼさず、動物で免疫毒性、過形成又は腫瘍発生を誘発しないこと、また sotatercept のリガンドが結合する受容体がヒトにおけるがん原性と直接的に関連しないことを示している。本 WOE に基づき、sotatercept のがん原性リスクは低いと考える。

アクチビン A の薬理学的作用に関する文献から、一部の免疫細胞において免疫機能を調節する可能性が示唆されるものの、sotatercept が免疫機能に影響するという明確なエビデンスはない。試験（TT #[redacted]-7826、試験は早期中止）でみられたマラリア感染及び1匹のサルでの劇症マラリアによる計画外の死亡は、免疫機能の変化を示唆している可能性があるが、赤血球生成促進剤により潜在的な宿主細胞集団が増加し、マラリア原虫感染が亢進する可能性があることは広く認識されている[4.3: 084XWP]。そのため、sotatercept を介した免疫機能の変化ではなく、sotatercept を介した RBC の増加によりマラリア原虫感染に対する試験動物の感受性が高まったと考えられる。

完了した sotatercept の非臨床試験のうち、サルを用いた27週間投与試験（TT #[redacted]-7812）の10 mg/kg Q2W 以上の用量群の胸腺及び9ヵ月間投与試験（TT #[redacted]-7938）の2.6 mg/kg Q4W 以上の用量群の脾臓において、軽微から中等度のリンパ球の枯渇が認められた。しかし、評価した全用量群のサル及び成熟ラットにおいて、胸腺又は脾臓の変性又は壊死を示す所見、その他のリンパ組織における毒性所見、循環血中白血球の意味のある変化及び血清中グロブリン濃度の変化はみられなかった。幼若ラットで認められたリンパ系の変化は、概して脾臓の白脾髄辺縁帯における軽微から軽度の細胞充実性の低下、あるいは赤脾髄における軽微から軽度の細胞充実性の増加のみであった。幼若ラットを用いた重要な試験（TT #[redacted]-7864）では、TDAR アッセイにおいて被験物質と関連する変化は認められず、イムノフェノタイピングデータからは免疫抑制は示唆されなかった。最後に、いずれの sotatercept の非臨床試験においても、過形成を示す強いシグナル及び腫瘍形成に係わるエビデンスは認められなかった。また、臨床で免疫抑制を示唆する明確なシグナルは認められなかった。結論として、非臨床試験のデータを総じて、sotatercept には毒性学的に意味のある免疫調節作用はないことが示唆される。

Sotatercept の投与により、ラット（0.3 mg/kg Q1W 以上）の精巣輸出管／精巣毒性、雌雄ラットの受胎能に対する有害な影響（雌で15 mg/kg Q1W 以上、雄で30 mg/kg Q1W）及び生殖発生毒性が認められ、これらは全て生殖におけるアクチビンの役割に一致する[4.3: 080SJ7]。生殖腺の病理組織学的所見は完全には回復しなかったにもかかわらず、雄ラットの受胎能に対する有害な影響は可逆的であった。雄ラットを用いた受胎能試験では、全用量群で不可逆的な精巣輸出管／精巣毒性がみられ（NOAEL は0.3 mg/kg Q1W 未満）、関連する所見として30 mg/kg Q1W 群でのみ可逆的な雄受胎能の有害な変化が認められた。このため、雄受胎能の変化に対する NOAEL は3 mg/kg Q1W（$AUC_{0\text{-}504h}$ は8,880 µg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の2倍）であった。雌受胎能試験では、15 mg/kg Q1W 以上（$AUC_{0\text{-}504h}$ は36,900µg·hr/mL 以上、MRHD での臨床曝露量の9倍）の用量群で受胎率及び妊孕率の低下、並びに着床前及び着床後胚損失率の上昇が認められ、50 mg/kg Q1W（$AUC_{0\text{-}504h}$ は86,283 µg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の21倍）群でのみ、性周期の延長がみられた。雌受胎能試験における受胎能及び発生に対する NOAEL は5 mg/kg Q1W（$AUC_{0\text{-}504h}$ は8,205 µg·hr/mL）であり、曝露量は MRHD での臨床曝露量の2倍であった。

EFD 毒性試験において sotatercept の胎盤通過性が示されたものの、ラット又はウサギで催奇形性は認められなかった。ラットを用いた EFD 毒性試験では、50 mg/kg（$AUC_{0\text{-}504h}$ は59,655 µg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の15倍）群で着床後胚損失率の上昇、15 mg/kg（$AUC_{0\text{-}504h}$ は15,264 µg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の4倍）以上の用量群で骨化遅延と関連する胎児体重の減少及び50 mg/kg 群で骨化に係わる変化（関連する胸椎及び腰椎数の増加／減少を伴う過剰肋骨の発現頻度増加）が認められた。ラットを用いた EFD 毒性試験の NOAEL は5 mg/kg（$AUC_{0\text{-}504h}$ は7,926 µg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の2倍）であった。ウサギを用いた EFD 毒性試験でも同様の所見が認められた。5 mg/kg（$AUC_{0\text{-}504h}$ は15,042 µg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の4倍）群で着床後胚損失率の上昇、1.5 mg/kg 以上（$AUC_{0\text{-}504h}$ は2,456 µg·hr/mL 以上、MRHD での臨床曝露量の0.6倍）の用量群で有害な胎児体重の減少が認められ、5 mg/kg で認められた骨化遅延と関

連した。ウサギを用いた EFD 毒性試験の NOAEL は0.5 mg/kg（$AUC_{0\text{-}504h}$ は1,477 μg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の0.4倍）であった。出生前及び出生後の発生に関する試験において、乳汁を介して sotatercept に曝露された出生児に、sotatercept と関連する発育遅延（授乳期に5 mg/kg 以上を投与した母動物の出生児における体重減少及び性成熟の遅延）が認められた（授乳期投与の NOAEL は1.5 mg/kg、$AUC_{0\text{-}504hr}$ は2,403 μg·hr/mL、MRHD での臨床曝露量の0.6倍）。雌受胎能試験並びにラット及びウサギの EFD 毒性試験で認められた発生及び生殖への影響は、sotatercept を介した ActRIIA シグナル伝達の阻害と機序的に一致する。アクチビン A あるいは B は卵巣の濾胞形成に影響し、妊娠の成立及び維持に関与する[4.3: 08DF5Q][4.3: 080SJ7][4.3: 08DJNP][4.3: 08DF5M]。アクチビン[4.3: 080SJ7][4.3: 08DJNP][4.3: 08DF5M]及び BMP[4.3: 08DF5J]は ActRIIA を介してシグナル伝達を行うが、これらは子宮内膜受容性及び胚着床の重要な調節因子でもある。胚あるいは胎児発生では、ActRIIA シグナル伝達は軟骨及び骨の形成／発達中に起こり[4.3: 08DL7H]、アクチビン A シグナル伝達は成長の制御に重要である[4.3: 08DF5P]。

幼若ラットを用いた試験では体重減少及び性成熟の遅延が認められた。幼若動物並びに出生前及び出生後の発生に関する試験において乳汁を介して sotatercept に曝露された出生児で認められた成長及び成熟に対する影響は、ActRIIA シグナル伝達の阻害に一致するものであった。その他の sotatercept に起因する毒性は成熟ラットでの毒性に類似したものの、成熟ラットと比較して概して程度が高く、低い用量で認められた。有害な影響は全用量で認められた（幼若ラットを用いた重要な試験における NOAEL は1 mg/kg Q1W 未満、$AUC_{0\text{-}504h}$ は9,240 μg·hr/mL 未満、MRHD での臨床曝露量の2倍未満）。

結論として、sotatercept と結合するリガンドである TGF-β スーパーファミリーは、多数の組織及び器官系の成長、発生及び恒常性に幅広い影響を及ぼす。Sotatercept の非臨床毒性試験において、有害な影響の可能性を広範に評価した。ラット及びサルで認められた腎障害は、これまでに実施された臨床試験ではヒトで認められていない。サルの脈絡叢で認められた組織形態学的変化は、その他の脳の構造変化又は行動変化と関連せず、有害ではないと考えられた。ラットでは、心臓重量に対する影響は有害ではなく可逆的であり、精巣輸出管／精巣及び副腎の変化は、それぞれ器官の構造及び成熟パターンの相違に基づき、ヒトで認められる可能性は低いと考えられる。Sotatercept は雌雄ラットの受胎能に有害な影響（雄では可逆的）を及ぼし、胎盤通過性が示されており、ラット及びウサギを用いた EFD 毒性試験、並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において出生児の体重減少及び大部分が可逆的な骨化に係わる変化が認められた（乳汁を介してのみ sotatercept に曝露されたラット出生児を含む）。Sotatercept の影響は幼若ラット及び成熟ラットで類似したものの、幼若動物では概して成熟動物より高い感受性を示した。最後に、ラット及びサルで認められた赤血球系の変化は臨床試験でも認められたが、可逆的であり、有害ではないと考えられた。非臨床プロファイルは、WHO 分類第1群である PAH の治療のための sotatercept の安全な使用を支持するものである。

2.6.6.10　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

略号及び用語の定義
2.6.7　毒性試験概要表
2.6.7.1　毒性試験：一覧表
2.6.7.2　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表
2.6.7.3　トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧
2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧
2.6.7.5　単回投与毒性試験
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験
2.6.7.7.A　反復投与毒性試験：ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7823）
2.6.7.7.B　反復投与毒性試験：ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与トキシコキネティクス試験（TT #[redacted]-7833）
2.6.7.7.C　反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた2ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7824）
2.6.7.7.D　反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた13週間の回復期間を伴う27週間反復皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7812）
2.6.7.7.E　反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた3ヵ月間の回復期間を伴う9ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7938）
2.6.7.8　In vitro 遺伝毒性試験
2.6.7.9　In vivo 遺伝毒性試験
2.6.7.10　がん原性試験
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験
2.6.7.12　生殖発生毒性試験（受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験）
2.6.7.12.A　Sprague Dawley ラットを用いた13週間の回復期間を伴う週1回皮下投与による GLP 適用の雄受胎能に関する試験（TT #[redacted]-7840）
2.6.7.12.B　雌ラットを用いた皮下投与による受胎能及び初期胚発生に関する試験（TT #[redacted]-7863）
2.6.7.13　生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験）
2.6.7.13.A　ラットを用いた皮下投与による発生毒性試験（サテライト群でのトキシコキネティクス評価を含む）（TT #[redacted]-7913）
2.6.7.13.B　ウサギを用いた週1回皮下投与による GLP 適用の胚・胎児発生毒性試験（TT #[redacted]-7841）
2.6.7.14　生殖発生毒性試験（出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験）－ラットを用いた皮下投与による GLP 適用の発生及び出生前／出生後の生殖に関する試験（出生後の行動／機能評価を含む）（TT #[redacted]-7830）
2.6.7.15　生殖発生毒性試験（幼若動物を用いた試験）－幼若ラットを用いた回復期間を伴う

13週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7864）
2.6.7.16 局所刺激性試験
2.6.7.17 その他の毒性試験

略号及び用語の定義

Abbreviation/Acronym	Definition
Sotatercept	Also referred to as MK-7962

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Test Article: Sotatercept

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Single-Dose Toxicity	Rat / Crl:CD(SD)	IV (bolus)	Single dose	0, 10, 30	No	[redacted]	TT #[redacted]-7825	[4.2.3.1.1: TT[redacted]7825]
Repeat-Dose Toxicity	Rat / Crl:CD(SD)	SC	3 months	0, 0.3, 3, 30 Q1W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7823	[4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]
	Rat / Crl:CD(SD)	SC	3 months	0, 0.3, 3, 30 Q1W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7833	[4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]
	Rat / Crl:CD(SD) IGSBR/ equivalent	IV (infusion)	4 weeks	0, 1, 10, 30 Q1W[b]	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7846	[4.2.3.2.3: TT[redacted]7846]
	Monkey / Cynomolgus	SC	3 months	0, 10, 30, 50 Q2W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7824	[4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]
	Monkey / Cynomolgus	SC	27 weeks	0, 10, 30, 50 Q2W[c]	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7812	[4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]
	Monkey / Cynomolgus	SC	9 months	0, 10, 30, 50 Q2W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7826[d]	[4.2.3.2.6: TT[redacted]7826]
	Monkey / Cynomolgus	SC	9 months	0, 1, 2.6, 10 Q4W; or 10 Q2W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7938	[4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]
	Monkey / Cynomolgus	IV (infusion)	4 weeks	0, 1, 10, 30 Q1W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7847	[4.2.3.2.8: TT[redacted]7847]

Confidential

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Sotatercept

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat / Crl:CD(SD)	SC	10 weeks prior to cohabitation through Day 85	0, 0.3, 3, 30 Q1W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7840	[4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]
	Rat / Crl:CD(SD)	SC	14 days prior to cohabitation through GD 7	0, 5 (developmental toxicity), 15 (maternal toxicity), 50 Q1W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7863	[4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]
	Rat / Crl:CD(SD)	SC	GD 6 and 13	0, 5 (developmental toxicity), 15, or 50 (maternal toxicity) Q1W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7913	[4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913]
	Rabbit / Hra:(NZW)SPF	SC	GD 7 and 14	0, 5, 15, 50 Q1W	No	[redacted]	TT #[redacted]-7912	[4.2.3.5.2.2: TT[redacted]7912]
	Rabbit / Crl:KBL(NZW)	SC	GD 7 and 14	0, 0.5 (developmental toxicity), 1.5, 5 (maternal toxicity) Q1W	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7841	[4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841]
	Rat / Crl:CD(SD)	SC	GD 6 and 13; or LD 1, 8, and 15	Gestation cohort: 0, 1.5, 5 (including maternal toxicity) Q1W on GD 6 and 13 (saline doses on LD 1, 8, 15) Lactation cohort: 0, 1.5 (developmental toxicity), 5, 10 (maternal toxicity) Q1W on LD 1, 8, 15 (saline doses on GD 6 and 13)	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7830	[4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]
	Rat / Crl:CD(SD)	SC	PND 7-91 (12 weeks)	0, 0.3, 3, 30 Q1W[e]	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7832	[4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7832]

Confidential

2.6.7.1 毒性試験：一覧表（続き）

Test Article: Sotatercept

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg[a])	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
	Rat / Crl:CD(SD)	SC	PND 7-91 (13 weeks)	0, 1, 3, 10 Q1W[b]	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7864	[4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]
Other Toxicity Studies	Mouse / ICR (CD-1)	IP	3 months	0, 10, 30, 50 TW of RAP-011	Yes	[redacted]	TT #[redacted]-7811	[4.2.3.7.7.1: TT[redacted]7811]
	Rat / Crl:CD(SD)	SC	13 weeks	0, 1, 10 Q1W; 10 of RAP-011 Q1W[f]	No	[redacted]	TT #[redacted]-7865	[4.2.3.7.7.2: TT[redacted]7865]

GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; IP=intraperitoneal(ly); IV=intravenous(ly); LD=lactation day; NOAEL=no-observed-adverse-effect level; NZW=New Zealand white; PND=postnatal day; Q1W=once weekly; Q2W=once every two weeks; Q4W=once every four weeks; RAP-011=the murine ortholog of sotatercept; SC=subcutaneous(ly); SD=study day; TW=twice weekly; USA=United States of America.

Testing Facilities: [redacted]

a Doses are mg/kg unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity and Reproductive and Developmental Toxicity, the NOAEL is underlined.

b TT #[redacted]-7846, TT #[redacted]-7864: NOAEL is <1 mg/kg Q1W.

c TT #[redacted]-7812: NOAEL is <10 mg/kg Q2W.

d Study terminated early due to high incidence of malaria in monkeys on study. On SD 57-58, data collection was suspended and the study was terminated to eliminate any interpretative complications due to an observed unusually high incidence of *Plasmodium spp*. organisms identified in peripheral blood smears. One animal that received 50 mg/kg Q2W was euthanized moribund with fulminant malaria.

e TT #[redacted]-7832: NOAEL is <0.3 mg/kg Q1W.

f Study included additional test articles. Full data set for these additional test articles are available in TT #[redacted]-7865 report and are not summarized in this sotatercept tabular summary.

Confidential

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Sotatercept

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location
3-Month Toxicity & TK[a]	Rat (SD)	SC	0, 0.3, 3, 30 Q1W	No[b]	TT #[redacted]-7823	[4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]
3-Month TK with 1-Month Recovery Period	Rat (SD)	SC	0, 0.3, 3, 30 Q1W	Yes	TT #[redacted]-7833	[4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]
4-Week Toxicity & TK[a]	Rat (SD)	IV (infusion)	0, 1, 10, 30 Q1W	No[b,c]	TT #[redacted]-7846	[4.2.3.2.3: TT[redacted]7846]
3-Month Toxicity &TK[a]	Monkey (cynomolgus)	SC	0, 10, 30, 50 Q2W	No[b]	TT #[redacted]-7824	[4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]
27-Week Toxicity & TK	Monkey (cynomolgus)	SC	0, 10, 30, 50 Q2W	Yes[c]	TT #[redacted]-7812	[4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]
9-Month Toxicity & TK	Monkey (cynomolgus)	SC	0, 1, 2.6, 10 Q4W; or 10 Q2W	Yes	TT #[redacted]-7938	[4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]
4-Week Toxicity & TK[a]	Monkey (cynomolgus)	IV (infusion)	0, 1, 10, 30 Q1W	No[b,c]	TT #[redacted]-7847	[4.2.3.2.8: TT[redacted]7847]
Female Fertility and Early Embryonic Development & TK	Rat (SD)	SC	0, 5, 15, 50 Q1W	Yes[c]	TT #[redacted]-7863	[4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]
Embryo-fetal Development & TK	Rat (SD)	SC	0, 5, 15, 50 Q1W	Yes	TT #[redacted]-7913	[4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913]
Dose Range Finding and Feasibility for Embryo-fetal Development & TK	Rabbit (New Zealand white)	SC	0, 5, 15, 50 Q1W	No	TT #[redacted]-7912	[4.2.3.5.2.2: TT[redacted]7912]
Embryo-fetal Development & TK	Rabbit (New Zealand white)	SC	0, 0.5, 1.5, 5 Q1W	Yes	TT #[redacted]-7841	[4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841]
12-Week Juvenile Toxicity with a 13-Week Recovery Period	Rat (SD)	SC	0, 0.3, 3.0, 30 Q1W	Yes	TT #[redacted]-7832	[4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7832]
13-Week Juvenile Toxicity with an 18-Week Recovery Period	Rat (SD)	SC	0, 1, 3, 10 Q1W	Yes	TT #[redacted]-7864	[4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]

GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous(ly); Q1W=once weekly; Q2W=once every two weeks; Q4W=once every four weeks; SC=subcutaneous(ly); TK=toxicokinetic(s).

a Only trough samples were collected, therefore a full toxicokinetic analysis could not be conducted.

b The overall study was conducted GLP, however the bioanalytical analysis was not conducted GLP.

c The overall study was conducted GLP, however the TK analysis was done using non-GLP software.

C Confidential

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Sotatercept

Dose (mg/kg)	Steady-State $AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)[a] Rat Female	Rat Male	Monkey Female	Monkey Male	Rabbit (pregnant) Female	Human $AUC_{0\text{-}28days}$ (µg· hr/mL)
Subcutaneous Administration						
0.1 Single Dose						372[b]
0.1 Multiple Dose (SD 85)						792[b]
0.3 Q1W: PND 91	850[c]	811[c]				
0.3 Q1W: SD 92	564[d]	654[d]				
0.3 Single Dose						1309[b]
0.5 Q1W (GD 7 and 14): GD 14					1070[e,f]	
0.7 Multiple Dose (steady state)						4110.24[g]
1 Q1W: PND 91	2900[h]	3270[h]				
1 Q4W: SD 253			6030[i,j]			
1 Single Dose						3551[b]
1.5 Q1W (GD 7 and 14): GD 14					1780[e]	
2.6 Q4W: SD 253			11,729[i,j]			
3 Q1W: PND 91	3680[c]	4380[c]				
3 Q1W: SD 92	1220[d]	2960[d]				
3 Q1W: PND 91	4940[h]	5100[h]				
5 Q1W (GD 7 and 14): GD 14					5264[k]	
5 Q1W (GD 7 and 14): GD 14					10,900[e]	
5 Q1W (GD 6 and 13): GD 13	2642[l]					
5 Q1W: SD 1	2735[m]					

Confidential

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

Test Article: Sotatercept

Dose (mg/kg)	Steady-State $AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)[a] Rat Female	Rat Male	Monkey Female	Monkey Male	Rabbit (pregnant) Female	Human $AUC_{0\text{-}28days}$ (µg· hr/mL)
Subcutaneous Administration						
10 Q1W: PND 91	16,000[h]	12,200[h]				
10 Q2W: SW 27			29,336[f,n]			
10 Q2W: SD 267			34,555[f,i]			
10 Q4W: SD 253			30,776[i,j]			
15 Q1W (GD 7 and 14): GD 14					28,120[k,o]	
15 Q1W (GD 6 and 13): GD 13	5088[l]					
15 Q1W: SD 1	12,300[m]					
30 Q1W: PND 7	17,900 / 20,500[c,p]	18,400[c]				
30 Q1W: SD 92	22,600[d]	28,000[d]				
30 Q2W: SW 27			87,589[f,n]			
50 Q1W (GD 7 and 14): GD 14					45,735[k]	
50 Q1W (GD 6 and 13): GD 13	19,885[l]					
50 Q1W: SD 1	28,761[m]					
50 Q2W: SW 27			165,039[f,n]			

(footnotes presented on the next page)

Confidential

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

Test Article: Sotatercept

$AUC_{0\text{-}Xh}$=area under the concentration-time curve from time 0 to X hours; $AUC_{0\text{-}Xdays}$=area under the concentration-time curve from time 0 to X days; GD=gestation day; PND=postnatal day; Q1W=once weekly; Q2W=once every two weeks; Q4W=once every four weeks; SC=subcutaneous(ly); SD=study day; SW=study week.

a TT #[redacted]-7823, TT #[redacted]-7824, TT #[redacted]-7846, and TT #[redacted]-7847 only had trough values collected and therefore no AUC could be generated.

b Clinical Study p010MK-7962 (SC Dosing).

c TT #[redacted]-7832 [4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7832] A Twelve-Week Toxicity Study of MK-7962 (Sotatercept) Administered by Subcutaneous Injection in Juvenile Rats, Including a Recovery Period

d TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833] A 3-Month Toxicokinetics Study of Sotatercept by Subcutaneous Injection in Rats with a 1-Month Recovery Period

e TT #[redacted]-7841 [4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841] A GLP Embryo-Fetal Development Study of Sotatercept Administered Once Weekly by Subcutaneous Injection in Rabbits

f $AUC_{0\text{-}366h}$ is presented for TT #[redacted]-7841 and $AUC_{0\text{-}336h}$ is presented for TT #[redacted]-7812 and for 10 mg/kg Q2W for TT #[redacted]-7938.

g $AUC_{0\text{-}21days}$ is presented.

h TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864] A Thirteen-Week Toxicity Study of Sotatercept Administered by Subcutaneous Injection in Juvenile Rats, Including a Recovery Period

i TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938] A 9-Month Toxicity Study of Sotatercept Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys, with a 3-Month Recovery Period

j $AUC_{0\text{-}672h}$ is presented for Q4W for TT #[redacted]-7938.

k TT #[redacted]-7912 [4.2.3.5.2.2: TT[redacted]7912] Subcutaneous Dosage-Range Developmental Toxicity Study of Sotatercept in Rabbits, Including a Satellite Toxicokinetic Evaluation

l TT #[redacted]-7913 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913] Subcutaneous Developmental Toxicity Study of Sotatercept in Rats, Including a Satellite Toxicokinetic Evaluation

m TT #[redacted]-7863 [4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863] A Fertility and Early Embryonic Development Study in Female Rats Administered Sotatercept Subcutaneously

n TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT[redacted]7812] A 27-Week Repeat Dose Subcutaneous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery

o $AUC_{0\text{-}144h}$ is presented for TT #[redacted]-7912 as there was an unexplained discrepancy in the serum concentration at 0 hours for this GD (168 hours following the first SC injection). Individual serum values were 2.7 to 4.4-fold higher than the serum concentrations at 144 hours following the first dose, which was considered not biologically plausible.

p TT #[redacted]-7832 $AUC_{0\text{-}96h}$ values at 3 mg/kg Q1W and $AUC_{0\text{-}72h}$ values at 30 mg/kg Q1W on PND 7 are reversed. The 96-hours postdose samples for Group 3 (3 mg/kg Q1W) female numbers [redacted], [redacted], and [redacted] were potentially switched with 72-hours postdose samples for Group 4 (30 mg/kg Q1W) female numbers [redacted], [redacted], and [redacted]. As a result, both the original results as well as the reversed calculations are presented.

C Confidential

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Sotatercept

Lot Number / Batch No.	Purity (%)	Potency	Specified Impurities Proposed Specification[a]					Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-7846	4-Week Toxicity & TK in Rats
								TT #[redacted]-7846	4-Week Toxicity & TK in Rats
								TT #[redacted]-7847	4-Week Toxicity & TK in Monkeys
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-7824	3-Month Toxicity & TK in Monkeys
								TT #[redacted]-7812	27-Week Toxicity & TK in Monkeys
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-7823	3-Month Toxicity & TK in Rats
								TT #[redacted]-7812	27-Week Toxicity & TK in Monkeys
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-7938	9-Month Toxicity & TK in Monkeys
								TT #[redacted]-7912	Dose Range Finding and Feasibility for Embryo-fetal Development & TK in Rabbits
								TT #[redacted]-7913	Embryo-fetal Development & TK in Rats
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-7863	Female Fertility and Early Embryonic Development & TK in Rats

C Confidential

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧（続き）

Test Article: Sotatercept

Lot Number / Batch No.	Purity (%)	Potency	Specified Impurities Proposed Specification[a]				Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	TT #[redacted]-7833	3-Month TK with 1-Month Recovery Period in Rats
							TT #[redacted]-7832	12-Week Juvenile Toxicity with a 13-Week Recovery Period in Rats
							TT #[redacted]-7864	13-Week Juvenile Toxicity with a 18-Week Recovery Period in Rats
							TT #[redacted]-7865	13-Week Rat Renal Toxicity in 5/6 nephrectomy or unilateral ureter ligation model
							TT #[redacted]-7840	Male Fertility in Rats
							TT #[redacted]-7841	Embryo-fetal Development & TK in Rabbits
							TT #[redacted]-7830	Perinatal/Postnatal development in Rats
							TT#[redacted]-7806	In vitro hERG assay

[redacted]; hERG=human ether-à go-go related gene; [redacted]; No.=number; TK= toxicokinetic(s).

a Specification limits based on drug substance specifications. All values reported as drug substance values.
b Research grade material.
c See [3.2.S.4.4 項] for final batch analysis.
d Ratio of Test [redacted] to Reference [redacted].

Confidential

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Sotatercept

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Rat / Crl:CD(SD)	IV (phosphate buffered saline)	0, 10, 30	12F control group 14F treatment group	30	>30	On SD 8 and 28, half of the animals from each group (6/control and 7/treated/groups) were euthanized. SD 8: No test article-related findings observed in adrenal glands. SD 28: Cortical necrosis with associated mineralization in 1/7 animals dosed at 10 mg/kg and 3/7 animals dosed at 30 mg/kg. Adrenal findings comprised ~ 30% to 70% of adrenocortical cross-sectional area and were bilateral. The findings were centered within the zona fasciculata or zona reticularis with complete sparing of the zona glomerulosa. The adrenal medulla was unaffected.	TT #[redacted]-7825 [4.2.3.1.1: TT[redacted]7825]

F=female; IV= intravenous(ly); No.=number; SD=study day.

Confidential

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Sotatercept

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Study Number
Rat / Crl:CD(SD) IGSBR/equivalent	IV (phosphate buffered saline)	4 weeks (total of 4 doses)	0, 1, 10, 30 Q1W	Main: 10F, 10M Recovery: 5F, 5M	<1 Q1W	TT #[redacted]-7846 [4.2.3.2.3: TT[redacted]7846]

Noteworthy Findings:

- Two unscheduled deaths (1 M at 10 mg/kg Q1W and 1 M at 30 mg/kg Q1W) of uncertain relationship to treatment.
- Hematology changes: On SD 29, mild ↑ in erythroid parameters at ≥1 mg/kg Q1W, slight ↑ in BM erythroid cell counts at ≥10 mg/kg Q1W (M) and ≥1 mg/kg Q1W (F), mild ↑ in reticulocytes at ≥1 mg/kg Q1W, mild ↑ in basophils at 10 mg/kg Q1W and large unstained cell counts at ≥10 mg/kg Q1W (M), and mild ↓ in MCH at ≥1 mg/kg Q1W, MCHC at ≥10 mg/kg Q1W and platelets at ≥10 mg/kg Q1W (M). On SD 57, BM changes had resolved but test article-related changes in RBC, HGB, HCT, and MCH persisted at ≥10 mg/kg Q1W.
- Serum chemistry changes: On SD 29, very slight to slight ↑ in ALT, AST and ALP in ≥10 mg/kg Q1W F and very slight ↑ in ALT in 10 mg/kg Q1W M. On SD 57, AST and ALP was still ↑ in 30 mg/kg Q1W F and ALP was ↑ in 10 mg/kg Q1W M.
- Organ weight changes with no histologic correlate: ↑ ovarian weight at ≥10 mg/kg Q1W, ↓ uterine weight at 30 mg/kg Q1W, ↓ heart weight at ≥1 mg/kg Q1W, ↓ kidney weight at ≥10 mg/kg Q1W. Organ weight changes without histologic correlates were nonadverse.
- In the testes in ≥10 mg/kg Q1W, sperm granulomas noted microscopically correlated with nodules/foci in epididymides observed grossly and testicular degeneration that often correlated with the presence of sperm granulomas and ↑ in mean testicular weight. In the adrenal gland in ≥1 mg/kg Q1W F, necrosis in the cortex and medulla correlated with ↑ in adrenal weights and enlargement/discoloration and foci noted grossly. Pancreas changes (apoptosis of pancreatic acinar cells, zymogen granule depletion and atrophy of pancreatic acini at ≥1 mg/kg Q1W) were generally minimal to mild in severity and were not considered test article-related due to presence in controls, low severity, or lack of reproducibility in any subsequent study.
- On SD 57, pancreatic changes at ≥1 mg/kg Q1W and ↓ in heart weight, sperm granuloma in the epididymides/testicular degeneration, and adrenal gland necrosis/chronic necrosis at ≥10 mg/kg Q1W had not resolved.
- ↓ Sperm motility and epididymal sperm count, and ↑ sperm fragmentation occurred at 30 mg/kg Q1W on SD 29. On SD 57, ↑ sperm fragmentation and ↓ sperm motility in 2/5 M at 10 mg/kg Q1W.
- At 1, 10, and 30 mg/kg Q1W, ADA detected on SD 29 in 7/10, 1/10, and 2/9 animals and on SD 57 in 4/10, 0/10, and 2/9 animals.
- Mean plasma concentrations data for sotatercept are presented below.

Dose (mg/kg)	SD 2 (µg/mL)	SD 29 (µg/mL)	SD 57 (µg/mL)
1 Q1W	8.02	9.66	0.18
10 Q1W	83.92	240.17	33.41
30 Q1W	190.90	324.41	22.63

Confidential

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Monkey / Cynomolgus	SC	9 months (terminated SW 9; total of 4 doses)	0, 10, 30, 50 Q2W	NA	NA	- Study terminated early due to high incidence of malaria in monkeys on study. On SD 57-58, data collection was suspended, and the study was terminated to eliminate any interpretative complications due to an observed unusually high incidence of *Plasmodium spp*. Organisms identified in peripheral blood smears. One animal that received 50 mg/kg Q2W was euthanized moribund with fulminant malaria. - As indicated in the literature, agents that stimulate erythropoiesis can increase susceptibility to malaria [2.6.6,3.3.3 項].	TT #[redacted]-7826 [4.2.3.2.6: TT[redacted]7826]
Monkey / Cynomolgus	IV (phosphate buffered saline)	4 weeks (total of 4 doses)	0, 1, 10, 30 Q1W	Toxicity Arm: 3F, 3M Recovery Arm: 2F, 2M	30 Q1W	- ↑ Erythroid mass parameters and reticulocytes at all doses during dosing and treatment-free periods; mild ↓ M:E ratio at 10 and 30 mg/kg Q1W. The magnitude of these changes was not considered adverse. - Mean plasma concentrations data for sotatercept are presented below.	TT #[redacted]-7847 [4.2.3.2.8: TT[redacted]7847]

Dose (mg/kg)	SD 1 (µg/mL)	SD 29 (µg/mL)	SD 57 (µg/mL)
1 Q1W	38.7	71.2	30.4
10 Q1W	323.1	503.2	239.0
30 Q1W	1682.5	1555.6	776.8

↓=decrease; ↑=increase; ADA=anti-drug antibody(ies); ALP=alkaline phosphatase; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase; BM=bone marrow; F=female; HCT=hematocrit; HGB=hemoglobin; IV=intravenous(ly); M=male; MCH=mean corpuscular hemoglobin; MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration; M:E=myeloid:erythroid; NA=not applicable; No.=number; NOAEL=no-observed-adverse-effect level; Q1W=once weekly; Q2W=once every two weeks; RBC=red blood cell count; SC= subcutaneous(ly); SD=study day; SW=study week.

C Confidential

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験：ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7823）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain: Rat / Crl:CD(SD)
Initial Age: ~ 6-8 weeks
Date of First Dose: [redacted] (M); [redacted] (F)
Dose Volume (mL/kg): 0.7 to 1.15

Duration of Dosing: 3 Months (total of 13 doses)
Duration of Postdose: 1 Month
Method of Administration: Subcutaneous Injection Q1W
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline

Study Number: TT #[redacted]-7823
Location in CTD: [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]
GLP Compliance: Yes[a]

Special Features: Immunogenicity (ADA) evaluation on SD 90 and 120 and steroid hormone (FSH) analysis on SD 28, 90, and 120
No-Observed-Adverse-Effect Level: 3 mg/kg Q1W

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Number of Animals – SD 90 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 120 (Recovery)	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5
Toxicokinetics – Mean Trough Serum Concentration (µg/mL)[b]								
SD 7 (end of 1st interval)	NE		2.37		29.61		132.80	
SD 90 (prior to Main necropsy)	NE		2.96		11.27		118.04	
SD 120 (end of recovery)	NE		0.51		0.98		2.38	
Immunogenicity (Incidence) – Overall Main[c]	0/10	0/10	2/9	5/10	9/10	6/10	8/10	4/9
Immunogenicity (Incidence) – Recovery[c]	0/5	0/5	2/5	2/5	4/5	3/5	3/5	3/5

Confidential

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7823 [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Number of Animals – SD 90 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 120 (Recovery)	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	1[d]	0	0	0	0	1[d]
Body Weight – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (%)– Main[e]	19.3 g	-	[4.7]	-	[14.0*]	-	[13.0*]	-
Food Consumption – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (SD 90) – Main[f]								
ABSRET (10^9/L)	183.2	221.8	180.2	277.9	[207.6]	[339.4*]	[300.2*]	[391.2*]
HGB (g/dL)	15.6	16.2	[16.3]	[16.9]	[16.5]	[17.9]	[16.6]	[17.9]
MCH (pg)	18.9	-	[18.2*]	-	[18.0*]	-	[18.0*]	-
MCV (fL)	53.3	-	[51.0*]	-	[50.4*]	-	[50.7*]	-
MPV (fL)	6.1	5.9	6.1	6.3	6.5	6.4	[6.5]	[6.5*]
RBC (M/µL)	8.3	9.4	[9.0*]	[10.0]	[9.2*]	[10.5]	[9.2*]	[10.8]
RDW (%)	11.4	13.5	[11.7]	[15.0*]	[12.4*]	[14.9]	[13.3*]	[16.0*]
Hematology (SD 120) - Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7823 [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Number of Animals – SD 90 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 120 (Recovery)	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Chemistry (SD 90)– Main[g]								
BUN (mg/dL)	15.2	13.6	15.4	14.6	17.1	16.3	[18.4]	[19.6*]
Clinical Chemistry (SD 120) – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
FSH analysis – Main	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
FSH analysis – Recovery	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Urinalysis – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (absolute, %) – Main[h]								
Adrenal gland	0.066 g	0.064 g	11.6	-6.6	18.9	7.7	[35.2*]	20.5
Heart	1.07 g	1.72 g	-6.4	-4.8	-8.4	[-14.3*]	-2.0	[-16.0*]
Kidney	-	3.76 g	-	-3.6	-	-7.2	-	[-19.0*]
Liver	8.04 g	-	6.1	-	1.0	-	[21.4*]	-
Organ Weights (relative to body weight, %) – Main[h]								
Adrenal gland	0.022	0.011	12.3	-8.7	21.4	5.2	26.2	[22.6*]
Heart	0.35	0.30	[-8.5*]	-7.9	[-7.2*]	[-16.3*]	[-9.3*]	[-13.7*]
Kidney	-	0.656	-	-5.9	-	-9.4	-	[-17.0*]

Confidential

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7823 [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Number of Animals – SD 90 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 120 (Recovery)	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5
Noteworthy Findings, Continued								
Organ Weights (relative to brain weight, %) – Main[h]								
Adrenal	0.032	-	12.0	-	20.7	-	[36.3*]	-
Liver	3.91	-	6.8	-	2.4	-	[20.7*]	-
Organ Weights – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology (Incidence) – Main								
Epididymis – mass, right	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/9
Kidney – lesion, left, perineal accumulation of renal fluid	0/10	0/10	0/9	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/9]
Kidney – lesion, right, perineal accumulation of renal fluid	0/10	0/10	0/9	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[2/9]
Seminal vesicle – reduced size	NA	1/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/9
Testes – reduced size, right	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/9
Gross Pathology – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology (Incidence) – Main								
Adrenals								
- cortical congestion, diffuse								
mild	0/10	0/10	[2/8]	0/10	[2/10]	0/10	[5/10]	[5/9]

Confidential

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7823 [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Number of Animals – SD 90 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 120 (Recovery)	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5
Noteworthy Findings, Continued								
Histomorphology (Incidence) – Main, Continued								
Adrenals, Continued								
- cortical congestion, focal								
mild	0/10	0/10	0/8	0/10	[1/10]	0/10	0/10	[1/9]
- mineralization, bilateral, multifocal								
minimal	0/10	-	0/8	-	0/10	-	[1/10]	-
moderate	0/10	-	0/8	-	0/10	-	[1/10]	-
Kidney								
- degeneration/necrosis, tubular, multifocal								
minimal	0/10	-	0/8	-	0/10	-	[1/10]	-
- glomerulonephritis, membranous, proliferative, multifocal								
minimal	0/10	0/10	0/8	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[4/9]
- glomerulonephritis, membranous, multifocal								
minimal	-	0/10	-	[1/10]	-	0/10	-	[1/9]
- basophilia, tubular-cell, multifocal								
minimal	0/10	3/10	0/8	[1/10]	[1/10]	[5/10]	[2/10]	[7/9]
mild	0/10	-	0/8	-	0/10	-	[1/10]	-

Confidential

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7823 [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Number of Animals – SD 90 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 120 (Recovery)	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5
Noteworthy Findings, Continued								
Histomorphology (Incidence) – Main, Continued								
Kidney, Continued								
- dilation, tubular, multifocal								
minimal	0/10	-	1/8	-	0/10	-	[1/10]	-
mild	0/10	-	0/8	-	0/10	-	[1/10]	-
- atrophy, unilateral, focal								
mild	0/10	-	0/8	-	0/10	-	[1/10]	-
- fibrosis, interstitial, unilateral, focal								
mild	0/10	-	0/8	-	0/10	-	[1/10]	-
- infiltrate, mononuclear cell, interstitial, multifocal								
minimal	0/10	-	1/8	-	3/10	-	[1/10]	-
Testes								
- hypospermatogenesis, unilateral								
moderate	NA	0/10	NA	0/10	NA	0/10	NA	[3/9]
- hypospermatogenesis, bilateral, locally extensive								
minimal	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/10	NA	0/9
- aspermatogenesis, unilateral, diffuse	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/9

C Confidential

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7823 [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 15
Number of Animals – SD 90 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 120 (Recovery)	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	M: 5
Noteworthy Findings, Continued								
Histomorphology (Incidence) – Main, Continued								
Testes, Continued								
- infiltrate, mononuclear cell, interstitial, diffuse minimal	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/9
- spermatid giant cell, scattered minimal	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/9
- atrophy, unilateral, multifocal mild	NA	0/10	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/9]
Histomorphology (Incidence) – Recovery								
Testes								
- aspermatogenesis, unilateral, diffuse	NA	0/5	NA	0/5	NA	0/5	NA	[1/5]
- aspermatogenesis, unilateral, locally extensive	NA	0/5	NA	0/5	NA	0/5	NA	[1/5]

(footnotes presented on the next page)

Confidential

2.6.7.7.A 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7823 [4.2.3.2.1: TT[redacted]7823]（続き）

- =no noteworthy findings; ABSRET=absolute reticulocytes; ADA=anti-drug antibody(ies); BUN=blood urea nitrogen; CTD=common technical document; ELISA=enzyme linked immunosorbent assay; F=female; FSH=follicle stimulating hormone; GLP=Good Laboratory Practice; HGB=hemoglobin; M=male; MCH=mean corpuscular hemoglobin; MCV=mean corpuscular volume; MPV=mean platelet volume; NA=not applicable; NE=group not examined; No.=number; Q1W=once weekly; RBC=red blood cell count; RDW=red cell distribution width; SD=study day; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# =number affected / number examined; *p<0.05.

a GLP compliant with the exception that toxicokinetic and immunogenicity evaluations did not have audits of sample testing phase and are consequently not fully compliant with GLP.

b Recovery animals were used for toxicokinetic evaluation.

c ADA positive incidence based on the ELISA assay.

d One F in the 0.3 mg/kg group was found dead on SD 61 with hemorrhage in the perisalivary (cervical) connective tissue, and one M in the 30 mg/kg group was found dead on SD 89 with gross and histological findings indicative of an ascending urinary tract infection. Both deaths and related findings were considered unrelated to sotatercept treatment.

e At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treatment groups, percent differences from controls are shown.

f Control and treatment group values are mean absolute values. The magnitude of hematological changes was not considered adverse and was consistent with the expected pharmacology of activin receptor IIA (ActRIIA) signal inhibition.

g Control and treatment group values are mean absolute values.

h For controls, mean organ weights (absolute or as percent of body or brain weight as indicated) are shown. For treatment groups, percent differences from controls are shown.

C Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験：ラットを用いた1ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与トキシコキネティクス試験（TT #[redacted]-7833）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain: Rat / Crl:CD(SD)
Initial Age: ~ 8 weeks
Date of First Dose: [redacted]
Dose Volume (mL/kg): 1
Duration of Dosing: 13 weeks (total of 14 doses)
Duration of Postdose: 4 weeks
Method of Administration: Subcutaneous Injection Q1W
Vehicle/Formulation: [redacted] in sterile water for injection, USP, [redacted]
Study Number: TT #[redacted]-7833
Location in CTD: [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]
GLP Compliance: Yes[a]

Special Features: Immunogenicity (ADA) evaluation predose and on SD 29, 57, 92/93, and 121, urinary biomarkers evaluation on SD 29, 93, and 121, and limited macro- and microscopic examination (kidneys only)
No-Observed-Adverse-Effect Level: 3 mg/kg Q1W

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Toxicokinetics – SD 1								
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	BLQ		233		2170		20,400	
C_{max} (µg/mL)	BLQ		1.65		16.1		179	
Toxicokinetics – SD 92								
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	BLQ		610		2090		25,300	
C_{max} (µg/mL)	BLQ		3.94		14.2		162	

Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Immunogenicity (Incidence) – Overall Main [d]	NE		6/26		19/26		9/25	
Immunogenicity (Incidence) – TK/Immunogenicity (Recovery) [d]	NE		0/10		5/10		1/10	
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals) – Main	0	0	0	0	0	0	0	2[e]
Mortality (No. of Animals) – TK/Immunogenicity (Recovery)	1[f]	0	1[g]	0	0	0	0	0
Body Weight (%)– Main on SD 92 [h]	317 g	-	[5.7]	-	[6.6]	-	[9.8]	-
Body Weight (%) – TK/Immunogenicity (Recovery) on SD 92 [h]	317 g	-	4.4	-	7.9	-	[17.4*]	-
Body Weight (%) – TK/Immunogenicity (Recovery) on SD 120 [h]	327 g	-	6.1	-	8.0	-	[17.1]	-
Clinical Observations – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – TK/Immunogenicity (Recovery)								
Distended Abdomen	0	0	0	0	0	0	[1]	[1]

Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Pathology[i]								
Hematology[j]								
HCT (%)								
SD 29 – Main	42.7	46.9	[45.3]	46.7	[45.4]	46.6	[47.7*]	[53.0*]
SD 93 – Main	41.3	45.0	[45.0*]	[46.9]	[46.0*]	[47.3]	[49.3*]	[54.3*]
SD 121 – Recovery	42.8	43.8	45.5	[46.6]	43.9	[47.9]	[49.5*]	[52.0*]
HGB (g/dL)								
SD 29 – Main	14.6	15.7	[15.3]	[15.4]	[15.1]	[15.3]	[15.7]	[17.1*]
SD 93 – Main	13.8	14.8	[14.9*]	[15.2]	[15.2*]	[15.5]	[16.0*]	[17.1*]
SD 121 – Recovery	14.2	14.3	14.8	[15.2]	14.6	[15.4]	[15.9*]	[16.2]
MCH								
SD 29 – Main	18.9	18.9	18.6	[17.9*]	[18.3*]	[18.1*]	[18.3*]	[17.4*]
SD 93 – Main	17.9	17.2	17.4	[15.9*]	17.3	[16.1*]	[16.9*]	[15.3*]
SD 121 – Recovery	18.1	17.0	18.2	16.4	18.3	[15.8*]	[16.3*]	[15.5*]

Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Pathology, Continued[i]	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology, Continued[j]								
MCHC								
SD 29 – Main	34.1	33.4	33.8	33.0	[33.4*]	33.0	[33.0*]	[32.3*]
SD 93 – Main	33.5	33.0	33.0	32.5	33.0	32.8	[32.6*]	[31.5*]
SD 121 – Recovery	33.1	32.6	32.6	32.6	33.3	32.2	[32.2*]	[31.1*]
MCV								
SD 29 – Main	55.6	56.5	55.1	[54.4*]	54.9	[54.9]	55.5	[53.8*]
SD 93 – Main	53.5	52.1	52.8	[49.1*]	[52.4]	[49.2*]	[52.0]	[48.5*]
SD 121 – Recovery	54.7	52.1	55.8	[50.2]	54.8	[49.0]	[50.7*]	[49.8]
Platelets (10^3/µL)								
SD 29 – Main	1148	1007	1002	1058	1087	1058	[996]	[783]
SD 93 – Main	1082	1033	939	988	913	952	[865]	[707*]
SD 121 – Recovery	969	1043	1042	896	1021	927	[745*]	[695*]

Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Pathology, Continued[i]								
Hematology, Continued[j]								
RBC (M/µL)								
SD 29 – Main	7.68	8.31	[8.22*]	[8.59]	[8.27]	[8.49]	[8.62*]	[9.87*]
SD 93 – Main	7.71	8.64	[8.53*]	[9.56*]	[8.80*]	[9.64*]	[9.52*]	[11.21*]
SD 121 – Recovery	7.82	8.41	8.16	[9.29]	8.01	[9.79*]	[9.78*]	[10.43*]
RDW (%)								
SD 29 – Main	11.5	12.1	[11.8]	[12.2]	[12.0]	[12.8*]	[13.0*]	[13.3*]
SD 93 – Main	12.7	14.3	[13.4]	[14.1]	[13.5]	[14.7]	[15.6*]	[16.4*]
SD 121 – Recovery	12.6	14.5	13.6	14.5	14.1	14.7	[16.4*]	[16.7*]
Reticulocytes (10^9/µL)								
SD 29 – Main	142.4	190.5	188.8	202.2	[208.1*]	216.9	[225.4*]	[291.7*]
SD 93 – Main	151.6	174.1	171.2	173.6	198.8	207.2	[282.5*]	[301.9*]
SD 121 – Recovery	154.0	163.5	162.6	147.6	125.9	163.9	174.6	[254.5*]

Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Pathology, Continued[i]								
Clinical Chemistry (Main and Recovery)	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinary Biomarkers								
Osteopontin (ng/mg Creatinine)								
SD 29 – Main	5.22	1.88	6.44	4.06	6.10	3.73	[5.67]	[5.61]
SD 93 – Main	4.21	2.14	5.52	2.70	6.51	3.02	[9.12]	[3.83]
SD 121 – Recovery	4.67	2.05	7.20	2.45	8.69	2.73	7.00	5.84
Lipocalin-2 (ng/mg Creatinine)								
SD 29 – Main	226	259	337	314	392	242	[1207]	[568]
SD 93 – Main	201	227	271	220	539	183	[1279]	[415]
SD 121 – Recovery	362	196	342	224	435	257	462	388
Albumin (ng/mg Creatinine)								
SD 29 – Main	26,691	16,266	24,836	30,638	34,712	29,079	29,806	95,799
SD 93 – Main	49,839	14,595	22,841	46,551	75,505	78,383	305,342	267,069
SD 121 – Recovery	23,714	19,407	23,922	18,314	47,964	65,292	[948,853]	[979,432]

Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Noteworthy Findings, Continued								
Gross Pathology (Incidence)								
Kidney enlargement – SD 93 (Main)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[1/8]
Kidney enlargement – SD 121 (Recovery)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	[2/5]
Histomorphology (Incidence) – Main								
Kidney								
- dilatation, cystic								
minimal	-	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[1/8]
mild	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[1/10]	-
- fibrosis, capsular								
minimal	-	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[1/8]
mild	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[1/10]	-
- glomerulonephritis, membranoproliferative								
minimal	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[1/10]	[2/10]	[2/10]	[1/8]
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[2/10]	[2/8]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[2/8]

Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Noteworthy Findings, Continued								
Histomorphology (Incidence) – Main, Continued								
Kidney, Continued								
- chronic progressive nephropathy								
minimal	0/10	-	0/10	-	[1/10]	-	[2/10]	-
mild	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[2/10]	-
- mineralization, interstitial								
minimal	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[3/10]	[7/8]
mild	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[1/10]	-
Histomorphology (Incidence) – Recovery								
Kidney								
- dilatation, capsular								
minimal	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	[1/5]
- fibrosis, capsular								
minimal	-	0/5	-	0/5	-	0/5	-	[2/5]

C Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.3		3		30	
Number of Animals – Total[b]	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16
Number of Animals – SD 93 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – SD 121 TK/Immunogenicity (Recovery)[c]	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)	F: 6 (5)	M: 6 (5)
Noteworthy Findings, Continued								
Histomorphology (Incidence) – Recovery, Continued								
Kidney, Continued								
- glomerulonephritis, membranoproliferative								
minimal	0/5	0/5	[1/5]	0/5	[1/5]	[2/5]	[2/5]	[3/5]
mild	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	[2/5]	[2/5]
- chronic progressive nephropathy								
minimal	0/5	1/5	[1/5]	[2/5]	0/5	[4/5]	[3/5]	[2/5]
mild	-	0/5	-	[1/5]	-	0/5	-	[2/5]
moderate	0/5	0/5	[1/5]	0/5	0/5	0/5	0/5	[1/5]
- mineralization, interstitial								
minimal	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	[2/5]	[5/5]

(footnotes presented on following page)

C Confidential

2.6.7.7.B 反復投与毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7833 [4.2.3.2.2: TT[redacted]7833]（続き）

- =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); $AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification (0.04 µg/mL); C_{max}=observed maximum concentration; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; HCT=hematocrit; HGB=hemoglobin; M=male; MCH=mean corpuscular hemoglobin; MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV=mean corpuscular volume; NE=not examined; No.=number; Q1W=once weekly; RBC=red blood cell count; RDW=red cell distribution width; SD=study day; TK=toxicokinetic(s); [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# =number affected / number examined; *p<0.05.

a GLP with the exception that urinary biomarker analysis was performed non-GLP.

b Six animals/sex/group assigned for the TK/immunogenicity sample collection.

c Of the six animals/sex/group assigned to the TK/immunogenicity sample collection, five animals/sex/group were maintained on study for the 1-month recovery period. The remaining one animal/sex/group was maintained on study through SD 121 as a potential replacement.

d ADA positive incidence.

e One M in the 30 mg/kg group was found dead on SD 57. The cause of death of this animal was not apparent based on the gross or microscopic examination of the kidneys; therefore, its relationship to sotatercept is considered to be uncertain. One additional 30 mg/kg M was sacrificed *in-extremis* with a fractured tibia/fibula that occurred during restraint for subcutaneous dosing on SD 92. This animal's findings are presented with the terminal phase animals.

f One F in the control group was euthanized on SD 113 due to a broken incisor tooth.

g One F in the 0.3 mg/kg group was euthanized on SD 59 due to a broken rostrum.

h For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

i Clinical pathology blood collection for one 30 mg/kg M occurred on SD 92 at the time of *in-extremis* sacrifice, and thus is not presented in the SD 93 values. However, the values are generally consistent with the SD 93 findings presented for the 30 mg/kg M.

j Control and treatment group values are mean absolute values.

C Confidential

2.6.7.7.C 反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた2ヵ月間の回復期間を伴う3ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7824）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain: Monkey / Cynomolgus
Initial Age: ~ 3 years
Date of First Dose: [redacted] (M); [redacted] (F)
Dose Volume (mL/kg): 0.20 to 0.98
Duration of Dosing: 3 months (total of 7 doses)
Duration of Postdose: 2 months
Method of Administration: Subcutaneous Injection Q2W
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline
Study Number: TT #[redacted]-7824
Location in CTD: [4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]
GLP Compliance: Yes[a]
Special Features: Immunogenicity (ADA) evaluation predose and on SD 15, 29, 57, 92, 120, and 148
No-Observed-Adverse-Effect Level: 30 mg/kg Q2W

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 92 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 148 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2
Toxicokinetics – SD 1 (end of 1st dose)								
$AUC_{0\text{-}312h}$ (µg· hr/mL)	NA[b]		32,139		82,389		107,155	
C_{max} (µg/mL)	NA[b]		142		351		530	
Immunogenicity (Incidence) – Overall Main[c]	NE	NE	0/4	0/4	0/4	0/4	0/6	1/6
Immunogenicity (Incidence) – Overall Recovery[c]	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0/2	0/2
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%) – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (g) – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

Confidential

2.6.7.7.C 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7824 [4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 92 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 148 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued								
Food Consumption – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Clinical Observations – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Ophthalmology – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Electrocardiography – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Hematology (SD 92) – Main[d]								
ABSRET (10^9/L)	81.80	70.27	[145.98*]	[176.10*]	[177.33*]	[178.45]	[163.65*]	[265.72*]
HCT (%)	43.02	43.53	[50.18]	[50.95*]	[53.80*]	[50.93]	[50.25*]	[51.75]
HGB (g/dL)	13.87	13.80	[15.68]	[15.75*]	[16.63]	[15.93*]	[15.20]	[15.35*]
MCH (pg)	23.38	24.12	[22.03]	[22.55*]	[22.35]	[22.13*]	[22.30]	[21.38*]
MCHC (g/dL)	32.27	31.72	[31.30]	[30.98]	[30.85*]	[31.33]	[30.23*]	[29.67*]
RBC (M/µL)	5.94	5.73	[7.15*]	[7.00*]	[7.45*]	[7.22*]	[6.82]	[7.24*]
RDW (%)	12.20	12.90	[14.38*]	[14.55*]	[14.58*]	[15.10*]	[14.85*]	[16.40*]
Hematology – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

C Confidential

2.6.7.7.C 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7824 [4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 92 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 148 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Chemistry (SD 92) – Main[d]								
BUN (mg/dL)	19.3	19.7	[25.8]	[28.5*]	[22.3]	[30.8*]	[26.3]	[28.7*]
CREA (mg/dL)	0.65	0.65	[0.83]	[0.83*]	[1.00*]	[0.88*]	[0.87*]	[0.85*]
Clinical Chemistry (SD 148) – Recovery[d]								
CREA (mg/dL)	0.60	-	NE	-	NE	-	[0.95*]	-
Coagulation – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Urinalysis – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Organ Weights – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Gross Pathology – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

Confidential

2.6.7.7.C 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7824 [4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 92 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 148 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – Main								
Kidney								
- hypercellularity, membranoproliferative glomerular, bilateral, diffuse								
mild	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[3/4]	[4/4]
moderate	0/4	-	0/4	-	0/4	-	[1/4]	-
- hypercellularity, membranoproliferative, glomerular, bilateral, multifocal								
mild	0/4	0/4	0/4	0/4	[2/4]	[1/4]	0/4	0/4
- fibrosis, corticomedullary, bilateral, focal								
minimal	-	0/4	-	1/4	-	0/4	-	[1/4][e]
- fibrosis, corticomedullary, bilateral, multifocal								
mild	-	0/4	-	0/4	-	1/4	-	[1/4][e]
moderate	0/4	-	0/4	-	0/4	-	[1/4][e]	-
- infiltrate, mononuclear cell, cortical, bilateral, multifocal								
mild	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4	1/4	[2/4][e]	[1/4][e]
- basophilia, tubular-cell, cortical, bilateral, multifocal								
mild	0/4	0/4	1/4	0/4	1/4	1/4	[1/4][e]	[1/4][e]

Confidential

2.6.7.7.C 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7824 [4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 92 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 148 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – Main, Continued								
Kidney, Continued								
- ectasia, tubular, bilateral, multifocal								
minimal	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	[1/4][e]	[1/4][e]
Histopathology (Incidence) – Recovery								
Kidney								
- hypercellularity, membranoproliferative glomerular, bilateral, multifocal								
mild	0/2	0/2	NE	NE	NE	NE	[2/2]	[2/2]
- fibrosis, corticomedullary, bilateral, multifocal								
mild	-	0/2	NE	NE	NE	NE	-	[1/2][e]
- infiltrate, mononuclear cell, cortical, bilateral, multifocal								
minimal	0/2	0/2	NE	NE	NE	NE	[1/2][e]	[2/2][e]
- basophilia, tubular-cell, cortical, bilateral, multifocal								
minimal	0/2	0/2	NE	NE	NE	NE	[2/2][e]	[1/2][e]
mild	-	0/2	NE	NE	NE	NE	-	[1/2][e]
- ectasia, tubular, bilateral, multifocal								
minimal	0/2	-	NE	NE	NE	NE	[1/2][e]	-

(footnotes presented on following page)

Confidential

2.6.7.7.C 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7824 [4.2.3.2.4: TT[redacted]7824]（続き）

- =no noteworthy findings; ABSRET=absolute reticulocytes; ADA=anti-drug antibody(ies); $AUC_{0\text{-}312h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 312 hours; BLQ=below limit of quantification; BUN=blood urea nitrogen; C_{max}=observed maximum concentration; CREA=creatinine; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; HCT=hematocrit; HGB=hemoglobin; M=male; MCH=mean corpuscular hemoglobin; MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration; NA=not applicable; NE=not examined; No.=number; Q2W=once every 2 weeks; RBC=red blood cell count; RDW=red cell distribution width; SD=study day; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# =number affected / number examined; *$p<0.05$.

a GLP with the exception that toxicokinetic and immunogenicity evaluations did not have audits of sample testing phase and are consequently not fully compliant with GLP.

b Sotatercept levels at 24 hours after the first dose (anticipated C_{max}) were BLQ in 11/12 control animals.

c ADA positive incidence. Plasma concentrations of sotatercept were uniformly above the interference threshold (5 to 10 µg/mL) throughout the sampling period; therefore, these immunogenicity data are considered equivocal due to potential assay interference.

d Control and treatment group values are mean absolute values.

e Secondary tubular changes resulted from the mild to moderate multifocal or diffuse membranoproliferative hypercellularity of the glomeruli.

C Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた13週間の回復期間を伴う27週間反復皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7812）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain: Monkey / Cynomolgus
Initial Age: 3 to 5 years
Date of First Dose: [redacted] (M); [redacted] (F)
Duration of Dosing: 27 weeks (total of 14 doses)
Duration of Postdose: 13 weeks
Method of Administration: Subcutaneous Injection Q2W
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline
Study Number: TT #[redacted]-7812
Location in CTD: [4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]
GLP Compliance: Yes[a]
Dose Volume (mL/kg): 0.2 to 1.1
Special Features: Immunogenicity (ADA) evaluation on predose and SD 8, 57, 85, 152 (females), 153 (males), 183, 190, and 274
No-Observed-Adverse-Effect Level: <10 mg/kg Q2W

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 190 (Main)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Number of Animals – SD 274 (Recovery)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Toxicokinetics – SD 1 (1st dose)								
$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg· hr/mL)	NA[b]		21,942		59,828		104,022	
C_{max} (µg/mL)	NA[b]		103		283		676	
Toxicokinetics – SW 27 (last dose)								
$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg· hr/mL)	NA[b]		29,336		87,589		165,039	
C_{max} (µg/mL)	NA[b]		187		443		1404	
Immunogenicity (Incidence) – Overall Main[c]	0/12		2/12		2/12		4/12	
Immunogenicity (Incidence) – Recovery on SD 274[c]	0/6		2/6		0/6		0/6	

C Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT [redacted]7812]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 190 (Main)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Number of Animals – SD 274 (Recovery)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	0	[2][d]	0	0	0
Body Weight (%) – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%) – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiology – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiology – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology (SD 190) – Main[e]								
ABSRET (10^9/L)	90.00	78.70	[150.82]	[199.73*]	[221.28*]	[180.35*]	[215.42*]	[199.70*]
HCT (%)	40.82	44.62	[49.03*]	[49.63]	[51.58*]	[57.08*]	[45.70]	[51.25]
HGB (g/dL)	11.18	12.18	[13.10*]	[13.43]	[14.05*]	[15.03*]	[11.87]	[13.75]
RBC (M/µL)	6.37	6.42	[7.52]	[7.20]	[7.66]	[8.33*]	[7.01]	[7.67*]
Hematology (SD 274) –Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 190 (Main)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Number of Animals – SD 274 (Recovery)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Chemistry (SD 152) – Main[e]								
BUN (mg/dL)	21.50	-	28.67	-	47.00*	-	[48.75*]	-
CREA (mg/dL)	0.67	-	0.85	-	1.02*	-	[1.15*]	-
Clinical Chemistry (SD 183) – Main[e]								
BUN (mg/dL)	19.67	-	30.50	-	28.75	-	[62.00*]	-
CREA (mg/dL)	0.60	-	0.82	-	0.83	-	[1.20*]	-
Clinical Chemistry (SD 190) – Main[e]								
BUN (mg/dL)	20.50	-	28.50	-	25.25	-	[71.50*]	-
CREA (mg/dL)	0.67	-	0.78	-	0.83	-	[1.35*]	-
Clinical Chemistry (SD 274) – Recovery[e]								
BUN (mg/dL)	20.00	-	17.67	-	22.33	-	[49.67]	-
CREA (mg/dL)	0.70	-	0.67	-	0.73	-	[1.17]	-
Coagulation – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT [redacted]7812]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 190 (Main)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Number of Animals – SD 274 (Recovery)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Noteworthy Findings, Continued								
Urinalysis/Urine Chemistry – Main	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights (absolute, %) – Main[f]								
Kidney	11.2403 g	12.8987 g	8.0	10.2	2.1	-2.3	[56.5*]	[12.3]
Thymus	3.8447 g	4.8657 g	-21.5	-27.7	9.8	-34.4	[-50.8]	[-46.6]
Organ Weights (relative to body weight, %) – Main[f]								
Kidney	0.53563 g	0.51481 g	-3.9	5.7	-2.6	7.5	[60.9]	[14.0]
Thymus	0.18428 g	0.19190 g	-32.6	-26.4	4.1	-27.1	[-50.0]	[-43.6]
Organ Weights (relative to brain weight, %) – Main[f]								
Kidney	0.19563 g	0.20177 g	6.5	20.3	0.6	-6.6	[46.4*]	[20.4]
Thymus	0.06690 g	0.07650 g	-22.6	-20.8	8.2	-37.7	[-53.8]	[-46.4]
Organ Weights – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	

C Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 190 (Main)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Number of Animals – SD 274 (Recovery)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Noteworthy Findings, Continued								
Gross Pathology (Incidence) – Main								
Kidney								
- discoloration, pale, bilateral	0/3	0/3	0/3	[1/3]	0/3	0/3	[1/3]	[1/3]
- discoloration, tan, bilateral	0/3	-	0/3	-	[2[g]/3]	-	[1/3]	-
- discoloration, mottled, bilateral	-	0/3	-	0/3	-	0/3	-	[1/3]
- enlargement	0/3	-	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-
- thicken, bilateral	0/3	-	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-
Gross Pathology (Incidence) – Recovery								
Kidney								
- discoloration, pale, bilateral	0/3	-	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-
- discoloration, mottled, bilateral	-	0/3	-	[1/3]	-	0/3	-	0/3
Histopathology (Incidence) – Main								
Brain – Choroid Plexus								
- foamy macrophage infiltration								
minimal	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	0/3	0/3	[1/3]
slight	0/3	-	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-

Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 190 (Main)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Number of Animals – SD 274 (Recovery)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – Main, Continued								
Kidney								
- tubulointerstitial nephritis								
minimal	0/3	-	[1/3]	-	[1/3]	-	0/3	-
slight	0/3	0/3	0/3	[1/3]	0/3	0/3	[1/3]	0/3
moderate	0/3	0/3	0/3	0/3	[1[g]/3]	0/3	[1/3]	[1/3]
marked	0/3	-	0/3	-	[1[g]/3]	-	[1/3]	-
- glomerular membranoproliferative hypercellularity								
minimal	0/3	0/3	0/3	1/3	[1[g]/3]	0/3	[2/3]	[1/3]
moderate	0/3	-	0/3	-	[1[g]/3]	-	0/3	-
Thymus								
- lymphoid depletion								
minimal	0/3	0/3	[3/3]	0/3	0/3	[1/3]	[1/3]	0/3
slight	0/3	0/3	0/3	[1/3]	0/3	0/3	[1/3]	[1/3]
moderate	0/3	-	0/3	-	[2[g]/3]	-	0/3	-

Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]（続き）

Q2W Dose (mg/kg)	0 (Control)		10		30		50	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 190 (Main)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Number of Animals – SD 274 (Recovery)	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – Recovery								
Brain – Choroid Plexus								
- foamy macrophage infiltration								
minimal	-	0/3	-	0/3	-	[1/3]	-	[1/3]
Kidney								
- tubulointerstitial nephritis								
minimal	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	[1/3]	[1/3]
slight	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	0/3
moderate	0/3	0/3	0/3	[2/3]	0/3	0/3	0/3	0/3
marked	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	0/3
- glomerular membranoproliferative hypercellularity								
minimal	1/3	0/3	0/3	0/3	[1/3]	[2/3]	[1/3]	[2/3]

(footnotes presented on following page)

Confidential

2.6.7.7.D 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7812 [4.2.3.2.5: TT[redacted]7812]（続き）

- =no noteworthy findings; ABSRET=absolute reticulocytes; ADA=anti-drug antibody(ies); $AUC_{0\text{-}336h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 336 hours; BLQ=below limit of quantification (0.3 µg/mL); BUN=blood urea nitrogen; C_{max}=observed maximum concentration; CREA=creatinine; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; HCT=hematocrit; HGB=hemoglobin; M=male; NA=not applicable; No.=number; Q2W=once every 2 weeks; RBC=red blood cell count; SD=study day; SW=study week; TK=toxicokinetic(s); [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# =number affected / number examined; *p<0.05.

a GLP compliant with the exception that test article characterization and stability were not performed GLP and TK analysis was done using non-GLP software.

b Sotatercept levels in control samples were all BLQ, except for one F on SD 57 (0.64 µg/mL).

c ADA positive incidence.

d Two F in the 30 mg/kg group were euthanized in moribund condition on SD 142 and 156. Clinical observations included hunched and thin appearance, cold to touch, decreased activity, rough hair coat, decreased food consumption, and dehydration. BUN and CREA values were moderately to markedly elevated and glomerular and tubulointerstitial nephritis were observed histologically.

e Control and treatment group values are mean absolute values.

f For controls, mean organ weights (absolute or as percent of body or brain weight as indicated) are shown. For treatment groups, percent differences from controls are shown.

g F euthanized moribund.

C Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験：カニクイザルを用いた3ヵ月間の回復期間を伴う9ヵ月間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7938）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain: Monkey / Cynomolgus
Initial Age: ~ 3 to 5 years
Date of First Dose: [redacted]
Dose Volume: 0.2 mL/kg
Duration of Dosing: 9 months (total of 10 or 20 doses)
Duration of Postdose: 3 months
Method of Administration: Subcutaneous Injection: 0, 1, 2.6, and 10 mg/kg Q4W, 10 mg/kg Q2W
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline
Study Number: TT #[redacted]-7938
Location in CTD: [4.2.3.2.7: TT [redacted]7938]
GLP Compliance: Yes[a]

Special Features: IHC evaluation of kidneys, choroid plexus, liver, and lung tissues for control (2M) and 10 mg/kg Q2W (1M/1F) groups; Immunogenicity (ADA) evaluation on two predose samples and SD 29, 85, 197, 253/267, 280, and 365; safety pharmacology core battery evaluations (neurological examination, body temperature, respiration rate, and blood pressure measurements); TEM of choroid plexus and kidney (control [1M] and 10 mg/kg Q2W [4M/1F])
No-Observed-Adverse-Effect Level: 1 mg/kg Q4W

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Toxicokinetics – SD 1										
$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg· hr/mL)	NA		NA		NA		NA		22,617	
$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg· hr/mL)	NA[b]		3945		12,188		26,116		NA	
C_{max} (µg/mL)	NA[b]		11.4		40.8		85.6		104.9	
Toxicokinetics – SW 17										
$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg· hr/mL)	NA		NA		NA		NA		32,019	
$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg· hr/mL)	NA[b]		3365		8441		28,724		NA	
C_{max} (µg/mL)	NA[b]		10.1		30.1		119.0		162.6	
Toxicokinetics – SW 37/39										
$AUC_{0\text{-}336h}$ (µg· hr/mL) – SW 39	NA		NA		NA		NA		34,555	
$AUC_{0\text{-}672h}$ (µg· hr/mL) – SW 37	NA[b]		6030		11,729		30,776		NA	
C_{max} (µg/mL)	NA[b]		21.4		51.2		126.7		164.4	

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Immunogenicity (Incidence) – Overall Main[c]	0/6	0/6	0/4	0/4	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Immunogenicity (Incidence) – Recovery on SD 365[c]	0/2	0/2	NE	NE	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Noteworthy Findings										
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	0	1[d]	0	0	1[e]	0	0[f]
Body Weight (%)– Main on SW 40[g]	2.98 kg	3.50 kg	4.0	-8.6	-6.7	2.0	-2.0	-12.0	[-8.4]	[-17.7]
Body Weight (%) – Recovery	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Food Consumption – Main	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption – Recovery	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – Main[d, e, f]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations – Recovery	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Neurological Evaluation – Main[h]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Temperature/Respiration Rate – Main[h]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiograms – Main	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiograms – Recovery	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure Measurements – Main	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure Measurements – Recovery	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Ophthalmic Examinations – Main[i]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Hematology (SD 85) – Main[j,k]										
HCT (%)	41.90	41.33	[49.40*]	[47.63*]	[47.07*]	[51.08*]	[48.63*]	[51.65*]	[47.13*]	[51.68*]
HGB (g/dL)	13.35	13.57	[15.60*]	[15.70*]	[15.18*]	[16.23*]	[15.58*]	[16.47*]	[15.40*]	[16.50*]
MCH (pg)	-	23.47	-	22.48	-	22.17	-	22.40	-	[21.68]
RBC (10^6/µL)	5.760	5.793	[6.545]	[6.980*]	[6.527]	[7.337*]	[7.070*]	[7.363*]	[6.773*]	[7.637*]
RDW (%)	12.73	12.72	13.45	13.40	13.47	13.73	[13.98*]	[14.38*]	[14.32*]	[14.78*]
Hematology (SD 182) – Main[j,k]										
HCT (%)	42.87	41.82	[49.60*]	[48.35*]	[48.50*]	[50.30*]	[48.12*]	[54.60*]	[49.48*]	[52.68*]
HGB (g/dL)	13.78	13.92	[15.98*]	[16.48*]	[16.12*]	[16.40*]	[15.67*]	[17.60*]	[16.12*]	[17.32*]
MCH (pg)	-	23.67	-	23.20	-	22.42	-	22.74	-	[21.55*]
MCV (fL)	72.60	71.32	74.88	68.03	71.10	68.75	[67.43]	70.62	[68.28]	[65.48*]
Platelet count (10^3/µL)	-	491.5	-	524.3	-	390.2	-	366.8	-	[286.3*]
RBC (10^6/µL)	5.908	5.877	[6.648]	[7.103*]	[6.824*]	[7.320*]	[7.145*]	[7.762*]	[7.258*]	[8.037*]
RDW (%)	12.73	12.78	13.33	13.53	13.32	13.73*	[14.47*]	[14.94*]	[14.75*]	[15.33*]
Reticulocytes (10^5/µL)	0.493	0.503	[0.933*]	[0.760]	[0.792]	[0.633]	[1.070*]	[0.934*]	[0.965*]	[1.083*]

C Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Hematology (SD 280) – Main[j,k]										
HCT (%)	38.85	39.25	[43.60*]	[45.83*]	[44.04*]	[47.22*]	[46.18*]	[51.14*]	[47.15*]	[50.20*]
HGB (g/dL)	12.70	13.25	[14.48*]	[15.60*]	[14.42*]	[15.62*]	[15.05*]	[16.76*]	[15.27*]	[16.55*]
MCH (pg)	-	23.75	-	23.23	-	22.53	-	22.82	-	[21.45*]
MCV (fL)	71.05	70.47	72.95	68.18	72.00	68.27	[67.50]	69.62	[68.42]	[65.02]
Platelet count (10^3/µL)	-	499.3	-	550.3	-	400.8	-	368.2	-	[315.0*]
RBC (10^6/µL)	5.477	5.583	[6.003]	[6.733*]	[6.124*]	[6.927*]	[6.858*]	[7.360*]	[6.890*]	[7.727*]
RDW (%)	13.37	13.20	13.93	13.85	13.82	14.10	[14.82*]	[15.26*]	[15.88*]	[15.80*]
Reticulocytes (10^5/µL)	0.630	0.618	[1.108]	[0.945]	[1.274]	[0.912]	[1.120]	[1.254]	[1.968*]	[1.722*]
Hematology – Recovery[k]	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry (SD 85) – Main[j]										
BUN (mg/dL)	23.17	24.00	25.25	28.25	[28.33]	[32.33]	[34.83*]	[33.00]	[30.33]	[31.00]
CREA (mg/dL)	0.62	0.53	0.70	0.63	0.63	[0.72]	[0.75]	[0.70]	[0.75]	[0.75*]
Clinical Chemistry (SD 182) – Main[j]										
BUN (mg/dL)	23.67	24.00	23.50	26.50	[30.80]	[34.67*]	[41.83*]	[35.60*]	[29.67]	[27.00]
CREA (mg/dL)	0.65	0.58	0.73	0.70	[0.80*]	[0.88]	[0.95*]	[0.78]	[0.77]	[0.78]

C Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Clinical Chemistry (SD 280) – Main[j]										
BUN (mg/dL)	22.83	21.83	26.25	29.25	[30.00]	[31.83*]	[41.67*]	[32.60*]	[36.50*]	[40.0*]
CREA (mg/dL)	0.58	0.65	0.65	0.78	[0.66]	[0.82]	[1.03*]	[0.84]	[0.75]	[0.82]
Clinical Chemistry – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation – Main	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coagulation – Recovery	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Urinalysis/Urine Chemistry (SD 280) – Main										
Increased protein	-	-	-	-	[P]	[P]	[P]	[P]	[P]	[P]
Increased occult blood	-	-	-	-	-	-	[P]	[P]	[P]	[P]
Urinalysis/Urine Chemistry (SD 281) – Main										
Increased protein	-	-	-	-	[P]	[P]	[P]	[P]	[P]	[P]
Increased occult blood	-	-	-	-	-	-	[P]	[P]	[P]	[P]
Urinalysis – Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT [redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
IHC – Main										
Kidney										
- increased granular deposits, glomerulus	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]
- increased granular deposits and/or increased cytoplasmic granules, proximal tubular epithelium	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]
- increased staining, proteinaceous material, proximal tubular lumens	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]
- increased staining, interstitium	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]
- increased staining, macula densa, distal tubule	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]
Choroid plexus										
- increased granular deposits, intima/media, artery/arteriole	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]
- increased staining, foamy macrophages, choroid plexus	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]
- increased staining, interstitium, choroid, plexus	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[P]	[P]

C Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
TEM (Incidence) – Main										
Kidney										
- increased mesangial cells	NE	0/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[1/1]	[2/4]
- epithelial cell swelling	NE	0/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[1/1]	[2/4]
- foot process fusion and attenuation (effacement)	NE	0/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[1/1]	[4/4]
- basement membrane expansion	NE	0/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0/1	[1/4]
- cytoplasmic vacuoles (droplets) in mesangial cells of glomeruli	NE	0/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0/1	[3/4]
- cytoplasmic vacuoles (droplets) in epithelial cells of glomeruli	NE	0/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0/1	[2/4]
- cytoplasmic vacuoles (droplets) in endothelial cells of glomeruli	NE	0/1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0/1	[1/4]
Choroid plexus										
- vacuolated macrophages in interstitium	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[1/1]	[2/4]
- expanded interstitium	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[1/1]	[1/4]

C Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Bone Marrow Evaluation – Main										
M:E ratios	1.3	1.3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	[0.8]	[0.9]
Bone Marrow Evaluation – Recovery	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	-
Gross Pathology (Incidence) – Main[l]										
Kidney										
- size increased	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	0/4	[1/4]
- cortex, discoloration, pale or red	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	0/4	[2/4]
- corticomedullary junction, discoloration, red	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	[1/4]
- cortex, irregular surface	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	0/4	[1/4]
Gross Pathology (Incidence) – Recovery										
Kidney										
- cortex, discoloration, red	-	0/2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	[1/2]
- cortex, irregular surface	-	0/2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	-	[1/2]

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Organ Weights (%)– Main[m]										
Kidney										
Absolute	-	14.6335 g	-	-8.8	-	-4.8	-	1.8	-	[56.4*]
Relative to body weight ratio	-	4.0125	-	3.7	-	0.3	-	25.6	-	[116.3*]
Relative to brain weight ratio	-	0.2050	-	-3.7	-	-1.2	-	4.0	-	[69.5*]
Spleen										
Absolute	3.2633 g	3.6435 g	-28.5	-8.4	-32.6	-12.4	[-36.1*]	[-21.9]	[-54.8*]	[-50.7*]
Relative to body weight ratio	1.0183	0.9975	-26.7	2.2	-21.6	-7.1	[-21.3]	[-3.4]	[-44.9]	[-37.6*]
Relative to brain weight ratio	0.0538	0.0508	-31.2	-2.6	-36.2	-9.4	[-39.6*]	[-19.3]	[-48.0*]	[-46.9*]
Organ Weights – Recovery	-	-	NE	NE	-	-	-	-	-	-
Histopathology (Incidence) – Main[l]										
Kidney										
- membranoproliferative glomerulopathy										
minimal	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[2/4]	[1/4]	[1/4]	[2/4]
mild	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[2/4]

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Histopathology (Incidence) – Main, Continued[l]										
Kidney, Continued										
- interstitial inflammation with fibrosis										
minimal	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[1/4]	[1/4]	[1/4]	[1/4]
mild	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	0/4	[2/4]
- increased matrix corticomedullary junction										
minimal	0/4	0/4	[2/4]	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[2/4]	[3/4]	[4/4]
- decreased size of glomerular tufts										
minimal	1/4	0/4	0/4	1/4	[3/4]	[3/4]	[1/4]	[4/4]	[2/4]	[3/4]
mild	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	0/4	[1/4]
Brain, Choroid Plexus										
- foamy macrophage infiltrates										
minimal	1/4	0/4	0/4	1/4	[1/4]	[1/4]	0/4	[1/4]	[2/4]	[1/4]
mild	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	0/4	[2/4]
moderate	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Histopathology (Incidence) – Main, Continued[l]										
Brain, Choroid Plexus, Continued										
- mononuclear cell infiltrates (lymphocytes and plasma cells)										
minimal	1/4	0/4	[2/4]	[3/4]	[4/4]	[3/4]	[3/4]	[3/4]	[3/4]	[3/4]
mild	0/4	0/4	[1/4]	[1/4]	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
- thickened arterial tunica intima										
minimal	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	0/4	[1/4]	[2/4]	[3/4]
Spleen										
- reduced size/number of follicular germinal centers										
mild	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	0/4	[2/4]	0/4	[1/4]	[4/4]
moderate	0/4	0/4	0/4	0/4	[1/4]	[1/4]	0/4	0/4	0/4	0/4
Liver										
- mononuclear cell infiltrates										
minimal	1/4	1/4	[2/4]	[1/4]	[2/4]	[2/4]	[2/4]	[2/4]	[3/4]	[4/4]

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Histopathology (Incidence) – Main, Continued[l]										
Aorta Intima										
- basophilic deposits										
minimal	0/4	-	0/4	-	[1/4]	-	0/4	-	0/4	-
mild	0/4	-	[1/4]	-	0/4	-	[1/4]	-	0/4	-
Heart, Myocardium Pericardium, Perivascular										
- basophilic deposits										
minimal	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-	[1/4]
mild	0/4	-	[1/4]	-	0/4	-	0/4	-	0/4	-
Pancreas, Perivascular										
- basophilic deposits										
mild	-	0/4	-	0/4	-	[1/4]	-	0/4	-	0/4

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

Dose (mg/kg)	0 Q4W (Control)		1 Q4W		2.6 Q4W		10 Q4W		10 Q2W	
Number of Animals – Total	F: 6	M: 6	F: 4	M: 4	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6
Number of Animals – SD 281 (Main)	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4
Number of Animals – SD 366 (Recovery)	F: 2	M: 2	F: 0	M: 0	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2
Noteworthy Findings, Continued										
Histopathology (Incidence) – Recovery										
Kidney										
- interstitial inflammation with fibrosis										
minimal	0/2	0/2	NE	NE	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	[1/2]
- decreased size of glomerular tufts										
minimal	1/2	0/2	NE	NE	[1/2]	[2/2]	0/2	1/2	[1/2]	[2/2]

(footnotes presented on following page)

Confidential

2.6.7.7.E 反復投与毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7938 [4.2.3.2.7: TT[redacted]7938]（続き）

- =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); ALB=albumin; $AUC_{0\text{-}Xh}$=area under the concentration-time curve from time 0 to X hours; BLQ=below limit of quantification (0.3 µg/mL); BUN=blood urea nitrogen; C_{max}=observed maximum concentration; CREA=creatinine; CTD=common technical document; F=female; GLP=Good Laboratory Practice; HCT=hematocrit; HGB=hemoglobin; IHC=immunohistochemistry; M=male; MCH=mean corpuscular hemoglobin; MCV=mean corpuscular volume; M:E=myeloid:erythroid; NA=not applicable; NE=not evaluated; No.=number; P=present; Q2W=once every 2 weeks; Q4W=once every 4 weeks; RBC=red blood cell count; RDW=red cell distribution width; SD=study day; SW=study week; TEM=transmission electron microscopy; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# =number affected / number examined; *p≤0.05.

a GLP compliant with the exceptions that polymerase chain reaction analysis used for prestudy animal health screening and IHC staining to investigate immune complex deposition was not performed GLP.

b Sotatercept levels in control samples were all BLQ.

c ADA positive incidence.

d One F in the 2.6 mg/kg Q4W group had hunched appearance, low food consumption, and watery feces beginning on SD 97. Additional clinical signs and body weight losses were noted for several weeks. On SD 153, the animal was clinically emaciated and euthanized.

e Beginning on SD 104 and continuing to SD 110, one M in the 10 mg/kg Q4W group had watery feces and was treated. Watery feces reoccurred on SD 114 to 116 and 123 to 129 with low food consumption on SD 115. The animal also had bruising at site of blood collection, hunched appearance, slight dehydration, reddened area on the face and decreased activity. On SD 133, the animal had a severe laceration on the tip of its tail. The animal was observed sucking on the tail tip causing additional wounding. Increased skin turgor, swelling on the face and nose were also observed. On SD 136, the tail tip was amputated and sutured. The animal was clinically emaciated with distended abdomen and was euthanized on SD 153.

f One M in the 10 mg/kg Q2W group was moved from the recovery group to the main group due to deteriorating clinical condition related to treatment with sotatercept. Necropsy revealed enlarged kidneys, discoloration of the renal cortex, and irregular renal cortical surfaces. On SD 280, treatment-related changes in hematology included an increase in indicators of circulating erythrocyte mass and reticulocyte count, decreased MCV and MCH, and increased RDW. Cytological examination of the bone marrow revealed mild lymphoid hypocellularity. This was considered to be possibly related to treatment with sotatercept. Treatment-related serum chemistry changes included increased BUN and creatinine, minimally decreased ALB, mildly increased globulin and fibrinogen, which were considered secondary to the poor clinical condition of the animal. Urinalysis revealed a treatment-related decrease in urine specific gravity, urinary protein excretion and the presence of occult blood, which were attributed to impaired renal function.

g For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

h Neurological and body temperature/respiration rate evaluations were performed on SD 3, 115, 199, and 255/269.

i Ophthalmic examinations were performed prestudy, and SW 26 and 39.

j Control and treatment group values are mean absolute values.

k Slight (2 to 3-fold pretest values), sporadic, non-dose-dependent increases in monocyte counts occurred in some animals at all dose levels during the dosing period and resolved during the treatment-free period. These monocyte changes did not directly correlate with mononuclear cell infiltrates in the liver, kidney, or choroid plexus of the brain.

l Incidence includes early euthanized animals (one 2.6 mg/kg Q4W F and one 10 mg/kg Q4W M).

m For controls, mean organ weights (absolute or as percent of body or brain weight as indicated) are shown. For treatment groups, percent differences from controls are shown.

C Confidential

2.6.7.8　In vitro 遺伝毒性試験

Sotatercept の in vitro 遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.7.9　In vivo 遺伝毒性試験

Sotatercept の in vivo 遺伝毒性試験は実施していない。

2.6.7.10　がん原性試験

Sotatercept のがん原性試験は実施していない。

C Confidential

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Sotatercept

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. per Group	Study Number
Rabbit / New Zealand White (Pregnant, Exploratory Range-Finding)	SC (phosphate buffered saline)	GD 7 and 14	0, 5, 15, 50 Q1W	5F/control group 8F/treatment group	TT #[redacted]-7912 [4.2.3.5.2.2: TT[redacted]7912]

Noteworthy Findings:

5 mg/kg:

- No test article-related clinical signs or effects on body weight, food consumption, or hematology.
- One TK female euthanized early due to abortion which was presumed related to sotatercept.
- At necropsy, fluid was observed in the pericardial sac in the TK female that aborted and one main study female.
- Reduced fetal body weights (↓ 14%), but no other cesarean-sections or litter parameters were affected.
- No main study female was ADA positive. One TK female tested positive for ADA on GD 14, but ADA did not affect PK in this animal.

15 mg/kg:

- Adverse clinical signs consisted of red discolored and/or swollen eyelids in three rabbits.
- Net body weight loss during postdose period and reduced body weight gain during dosage and postdose periods.
- No adverse effects on food consumption or hematology.
- At necropsy, fluid was observed in the pericardial sac in one female.
- Increased postimplantation loss (resorptions), resulting in reduced litter size and live fetuses, and increased percentage of resorbed conceptuses per litter. Reduced fetal body weights (↓ 35%). No other cesarean-sections or litter parameters were affected.
- Two main study females were ADA positive. No TK females were ADA positive.

50 mg/kg:

- Two main study females were euthanized on GD 23 based on adverse clinical signs (scant feces, red substance in cage pan, ungroomed coat, cold to touch). Two TK females were euthanized on GD 23 or 25 due to abortion.
- Adverse clinical signs consisted of red substance in the cage pan in three rabbits and red discolored eyelids in two rabbits.
- Reduced body weight gain or body weight loss after GD 15.
- No adverse effect on food consumption or hematology.
- At necropsy, fluid was observed in the pericardial sac in three main study females (including two that were euthanized early due to clinical signs) and the two TK females that aborted.
- One dam had a litter of all resorbed conceptuses. Increased postimplantation loss (resorptions), resulting in reduced litter size and live fetuses, and increased percentage of resorbed conceptuses per litter. Reduced fetal body weight (↓ 23%). No other cesarean-sections or litter parameters were affected.
- One main study female was ADA positive. No TK females were ADA positive.

C Confidential

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Sotatercept

Study Number
TT #[redacted]-7912, continued
[4.2.3.5.2.2: TT[redacted]7912]

Noteworthy Findings (Continued):

Sotatercept Toxicokinetic Parameters – GD 7

Dose (mg/kg)[a]	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	C_{max} (µg/mL)
5	5765	46.6
15[b]	23,682	213.0
50	52,327	416.9

Sotatercept Toxicokinetic Parameters – GD 14

Dose (mg/kg)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	C_{max} (µg/mL)
5	5246	46.9
15[b]	28,120	331.9
50	45,735	348.0

Sotatercept Serum Concentrations in Fetal Rabbits – GD 29

Dose (mg/kg)	Fetal (µg/mL)	Maternal (µg/mL)	Percent (Fetal/Maternal)
5	0.425	1.08	39%
15	1.30	5.44	24%
50	0.34	32.6	1%

C Confidential

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. per Group	Study Number
Rat / Crl:CD(SD) (Study in Juveniles)	SC ([redacted])	12 weeks with a 13-week recovery (total of 13 doses)	0, 0.3, 3, 30 Q1W (Group 1-4, respectively) from PND 7 to 91	Group 1-4[c]: Subset 1 (Main study): 10/sex; Subset 2 (Recovery study): 20/sex; Subset 3 (TK study): 21-24/sex; Subset 4 (TDAR/Immuno-phenotyping study): 20/sex[d] (Groups 1-3)	TT #[redacted]-7832 [4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7832]

Noteworthy Findings:

≥0.3 mg/kg Q1W:

- No test article-related changes in urinalysis, EPO, FOB parameters, or performance in the Morris watermaze.
- ↑ In parameters indicative of erythrocyte mass, ↑ BUN, CREA, and/or Phos, ↓ Alb with correlating microscopic findings in kidneys.
- Gross findings in testes (abnormal consistency and small size), prostate (small size), and/or kidneys (discoloration, fluid filled cysts).
- ↓ Heart weights in M.
- Kidney changes included mineralization of tubules, tubule dilatation, chronic progressive nephropathy, membranoproliferative glomerulonephritis, hemorrhage, atrophy/hypoplasia of tubules in medulla, and ↑ in stroma in medulla. Changes in other organs included mineralization of glandular stomach mucosa, degeneration/atrophy of seminiferous tubules, edema in testes. Marked reduction in sperm with ↑ cellular debris in epididymides. In spleen, ↓ cellularity in periarteriolar sheaths and/or marginal zones of white pulp, ↓ extramedullary hematopoiesis in red pulp, and/or ↑ cellularity in red pulp. In bone marrow of F, ↓ numbers (islands) of immature (blast) myeloid elements observed with relative or absolute ↑ erythroid elements and neutrophils. In thymus of F ↑ single cell necrosis of cells in cortex and medulla. Hypertrophy of cells in cortex of adrenal gland of F.
- Immunophenotyping assessment on PND 56 included ↑ lymphocyte, T cell, and B cell counts and ↓ NK cell and T cell percentages (F only) that were not toxicologically meaningful.

0.3 mg/kg Q1W:

- No test article-related unscheduled deaths.
- Clinical signs were limited to transient limited use of a limb.
- ↑ BMC and BMD were likely related to sotatercept.

0.3 mg/kg Q1W treatment-free period:

- No test article-related unscheduled deaths, clincal signs, BW changes, food consumption changes, or hematology changes.
- Clinical pathology changes included ↑ cholesterol in F on PND 237-239 and GD 13.
- ↓ Pregnancy rates in treated F.
- Postmortem effects were similar to those observed at end of dosing period. There were no findings in the pituitary, bone marrow, or thymus.
- Due to small number of animals remaining for the recovery period assessment, recovery for immunophenotyping changes could not be definitely determined.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Sotatercept

	Study Number
Noteworthy Findings (Continued):	TT #[redacted]-7832, continued
3 mg/kg Q1W (Similar changes to those seen at 0.3 mg/kg Q1W, with the following additions/differences):	[4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7832]
- There were test article-related unscheduled deaths, adverse clinical signs, ↓ in mean BW and BW gain in F (transient) and M, and ↓ food consumption in M. These antemortem findings were similar, but were generally less severe than those present at 30 mg/kg.	
- Delays in sexual maturation were considered secondary to effects on BW. ↓ in total time spent in movement during motor activity assessment in M.	
- Additional clinical pathology changes included ↑ in WBC parameters and fibrinogen and ↓ in platelets.	
- Additional organ weight changes included ↓ testes/epididymis, prostate, and spleen (F only) weights, and ↑ kidney weights.	
- Hyperplasia of Leydig cells occurred in testes, atrophy occurred in prostate and seminal vesicles, and hypertrophy was observed in pars distalis/pars intermedia of pituitary gland (F only).	
- Blood hormone concentrations included ↑ LH in M and ↓ LH and FSH in F.	
- No BMC and BMD changes noted.	
- TDAR assessment changes included ↓ T-dependent IgM antibody response to KLH.	
- Immunophenotyping assessment on PND 56 included statistically significantly higher B cell percentages in M, ↑ lymphocyte counts and B cell absolute counts.	
3 mg/kg Q1W treatment-free period (Similar changes to those seen at 0.3 mg/kg Recovery, with the following additions/differences):	
- One unscheduled death with clinical signs and postmortem findings that were generally similar to those present in the 3 mg/kg animals that died during the dosing period.	
- ↓ In mean BW in M persisted into the treatment-free period but had fully recovered prior to cohabitation.	
- Clinical pathology changes included ↑ erythroid mass in F, ↓ platelets in F, ↓ Alb in M, and ↑ fibrinogen in M and cholesterol in F and M. On GD 13 changes included ↑ ALT, AST, and glucose.	
- ↓ Fertility indices in F and M, ↓ Pregnancy rates in untreated F mated to treated M occurred. There was also an increase in the percentage of animals with nonviable embryos (including 1 litter with only nonviable embryos).	
- Postmortem changes were similar to those observed at the end of the dosing period. ↑ Cystic degeneration in adrenals in F.	
- Blood hormone concentrations included ↑ in LH and FSH in M. All hormone changes including those at the end of dosing period were of uncertain relationship to treatment and not considered toxicologically significant.	
- Global and proximal BMD and mid femur BMC and BMD were ↓ in M, but were considered of uncertain relationship to sotatercept treatment.	
30 mg/kg Q1W:	
- Dose group terminated on PND 30 due to high number of test article-related unscheduled deaths and declining clinical condition of remaining animals.	
- Clinical signs included dehydration, thin body appearance, decreased motor activity and/or ungroomed coat, and correlated with ↓ BW gain.	
- Additional clinical pathology changes included ↑ in liver transaminases.	
- Postmortem findings included red discoloration of the kidneys, tubular dilation/atrophy/hypoplasia/mineralization in kidney, hemorrhage/congestion in the renal medulla, adrenal congestion/vacuolation, mineralization of glandular stomach muscosa, and ↓ cellularity of white pulp and/or marginal zone in spleen.	

Confidential

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験（続き）

Test Article: Sotatercept

Study Number

TT #[redacted]-7832, continued
[4.2.3.5.4.1: TT[redacted]7832]

Noteworthy Findings (Continued):

ADA: No anti-sotatercept antibodies were detected in animals tested on PND 128 (PND 65 for 1 F at 3 mg/kg Q1W); antibodies were detected in samples from 1F on GD 13 at 0.3 mg/kg Q1W, and 1M on PND 239 and 1F on GD 13 at 3 mg/kg Q1W during the recovery period.

TK:

		PND 7		PND 91	
Dose (mg/kg)a	Sex	Cmax (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	Cmax (µg/mL)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)
0.3 Q1W	Female	2.38	226	5.93	850
	Male	2.61	253	5.27	811
3 Q1W	Female	122 23.4[e]	7550 2390[e]	26.0	3680
	Male	24.5	2550	29.6	4380
30 Q1W	Female	180 180[e]	17,900 20,500[e]	NA	NA
	Male	158	18,400	NA	NA

↓=decrease; ↑=increase; ADA=antidrug antibody(ies); Alb=albumin; ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate transferase; $AUC_{0\text{-}144h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 144 hours; $AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BMC=bone mineral content; BMD=bone mineral density; BUN=blood urea nitrogen; BW=body weight; C_{max}=observed maximum concentration; CREA=creatinine; EPO=erythropoientin; F=female; FOB=functional observational battery; FSH=follicle stimulating hormone; GD=gestation day; IgM=immunoglobulin M; KLH=keyhole limpet hemocyanin; LH=luteinizing hormone; M=male; NA=not applicable; NK=natural killer; No.=number; Phos=phosphorous; PK=pharmacokinetic(s); PND=postnatal day; Q1W=once weekly; SC=subcutaneous(ly); TDAR=T-cell dependent antibody response; TK=toxicokinetic(s); WBC=white blood cells.

a Three F/group assigned for the TK/immunogenicity sample collection; those that survived to scheduled termination were euthanized on GD 29 and examined for pregnancy status only.

b $AUC_{0\text{-}144h}$ is listed for the 15 mg/kg Q1W group.

c Due to unscheduled mortalities in Subset 1 (main study), additional F_1 M and F rats were re-assigned from Subset 2 (recovery study) to Subset 1 to ensure that at least 8 M and F F_1 rats were available for necropsy examination on PND 98 from Subset 1 in each dose group.

d Ten rats per sex/group in Groups 1 through 3 were selected for KLH administration on PND 42, and TDAR blood sample collection on PNDs 48 and 56; the remaining 10 rats/sex/group were selected for KLH administration on PND 218 or 223, and TDAR blood sample collection on PNDs 224 and 232 or PNDs 229 and 237, respectively.

e Values when 96 hour concentrations at 3 mg/kg Q1W and 72 hour concentrations at 30 mg/kg Q1W are reversed; an apparent processing error occurred.

C Confidential

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

2.6.7.12.A Sprague Dawley ラットを用いた13週間の回復期間を伴う週1回皮下投与による GLP 適用の雄受胎能に関する試験（TT #[redacted]-7840）

Test Article: Sotatercept

Design Similar to ICH 4.1.1? Yes
Species / Strain: Rat / Crl:CD(SD)
Initial Age: ~ 62 days (females) and 69 days (males) at receipt
Date of First Dose: [redacted]
Day of Mating: GD 0
Day of Cesarean-Section: GD 13
Method of Administration: Subcutaneous Injection Q1W
Dosing Volume: 1 mL/kg
Vehicle/Formulation: [redacted]
Study Number: TT #[redacted]-7840
Location in CTD: [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]
GLP Compliance: Yes

Special Features: Immunogenicity (ADA) evaluation on predose and SD 63/64 and 106
Treatment Interval (Females for fertility assessment): None
Treatment Interval (Males): 10 weeks prior to cohabitation, during cohabitation (cohabitation initiated on the day of the 10th dose), and through the day before euthanasia (SD 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78, and 85)
Recovery Interval (Males): A minimum of a 13-week recovery period was included for male rats not terminated at the end of the dosing period.
No-Observed-Effect Level: <0.3 mg/kg Q1W (general toxicity parameters) and 3 mg/kg Q1W (reproductive parameters)
No-Observed-Adverse-Effect Level: <0.3 mg/kg Q1W (general toxicity parameters) and 3 mg/kg Q1W (reproductive parameters)

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Immunogenicity (Incidence) – Overall Main[a]	0/30	16/30	17/30	18/29
Immunogenicitiy (Incidence) – Recovery[a]	0/15	7/15	7/15	11/15

Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings				
Mortality (No. of Animals)	1[b]	0	0	2[b]
Clinical Observations – Main	-	-	-	-
Clinical Observations – Recovery	-	-	-	-
Body Weight – Main	-	-	-	-
Body Weight – Recovery	-	-	-	-
Body Weight Gain SD 1 to 8 (%) – Main[c]	51.7 g	[-12*]	[-14**]	[-18**]
Body Weight Gain – Recovery	-	-	-	-
Food Consumption – Main	-	-	-	-
Food Consumption – Recovery	-	-	-	-
Organ Weights – Main	-	-	-	-
Organ Weights – Recovery	-	-	-	-
Gross Pathology (Incidence) - Main				
Epididymis				
- small, right	0/15	0/15	0/15	[2/15]
- small, left	0/15	0/15	0/15	[2/15]
- cauda, small, right	NE	[1/1]	NE	[1/1]

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Gross Pathology (Incidence) – Main, Continued				
Testis				
- small, right	0/15	[1/15]	0/15	0/15
- small, left	0/15	[1/15]	0/15	[2/15]
- abnormal consistency, right	0/15	0/15	[1/15]	0/15
- abnormal consistency, left	0/15	0/15	0/15	[1/15]
Gross Pathology (Incidence) – Recovery				
Testis				
- small, right	0/15	0/15	[1/15]	[1/15]
- small, left	0/15	[1/15]	0/15	0/15
- abnormal consistency, right	0/15	0/15	0/15	[1/15]
- abnormal consistency, left	0/15	0/15	0/15	[1/15]

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Main				
Efferent Ducts				
- infiltration, mixed cells				
minimal	1/15	0/15	[1/15]	[1/14]
mild	0/15	0/15	[1/15]	[2/14]
- sperm stasis				
minimal	0/15	[1/15]	[1/15]	0/14
mild	0/15	0/15	[1/15]	[2/14]
- sperm granuloma				
minimal	0/15	0/15	[1/15]	0/14
mild	0/15	0/15	0/15	[2/14]
marked	0/15	0/15	0/15	[1/14]

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT [redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Main, Continued				
Efferent Ducts, Continued				
- mineralization				
minimal	0/15	0/15	[1/15]	[5/14]
mild	0/15	[1/15]	0/15	0/14
- fibrosis				
minimal	0/15	[1/15]	[1/15]	[2/14]
Epididymis				
- decreased cellularity, sperm, right				
moderate	0/15	0/15	0/15	[1/14]
marked	0/15	0/15	[1/15]	[1/14]
severe	0/15	[1/15]	0/15	[1/14]
- decreased cellularity, sperm, left				
severe	0/14	[2/15]	0/14	[3/13]

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Main, Continued				
Testis/Seminiferous Tubules				
- degeneration/atrophy, tubular, right				
minimal	1/15	[1/15]	0/15	0/14
mild	0/15	0/15	0/15	[1/14]
moderate	0/15	0/15	0/15	[2/14]
marked	0/15	[1/15]	0/15	0/14
severe	0/15	0/15	[1/15]	0/14
- degeneration/atrophy, tubular, left				
minimal	0/15	[1/15]	0/15	0/14
moderate	0/15	0/15	0/15	[1/14]
marked	0/15	[2/15]	0/15	[2/14]

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Main, Continued				
Testis/Seminiferous Tubules, Continued				
- sperm stasis, rete testis, right				
mild	0/15	0/15	0/15	[1/14]
- sperm granuloma, rete testis, right				
mild	0/15	0/15	0/15	[1/14]
- dilation, tubular, right				
minimal	0/15	0/15	0/15	[1/14]
mild	0/15	0/15	0/15	[1/14]
- dilation, tubular, left				
mild	0/15	0/15	0/15	[2/14]

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Recovery				
Efferent Duct				
- infiltration, mixed cell				
minimal	0/11	0/14	[1/13]	0/12
mild	0/11	0/14	0/13	[2/12]
- sperm stasis				
minimal	0/11	0/14	[1/13]	[1/12]
- sperm granuloma				
mild	0/11	[1/14]	[1/13]	0/12
- mineralization				
minimal	0/11	[1/14]	0/13	[1/12]
- fibrosis				
minimal	0/11	[2/14]	[3/13]	[1/12]

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT [redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Recovery, Continued				
Epididymis	-	-	-	-
- decreased cellularity, sperm, right				
marked	0/14	0/15	[1/15]	[1/14]
- decreased cellularity, sperm, left				
marked	1/14	[1/15]	0/15	[1/14]
- infiltration, mixed cells, right				
minimal	0/14	[1/15]	[1/15]	0/14
- infiltration, mixed cells, left				
minimal	0/14	0/15	0/15	[1/14]
mild	0/14	[1/15]	0/15	0/14

Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Recovery, Continued				
Testis/Seminiferous Tubules				
- degeneration/atrophy, tubular, right				
minimal	1/14	[1/15]	0/15	[2/14]
moderate	0/14	0/15	0/15	[1/14]
marked	0/14	0/15	[1/15]	[1/14]
- degeneration/atrophy, tubular, left				
minimal	0/14	[2/15]	0/15	[1/14]
severe	1/14	[1/15]	0/15	[1/14]
- sperm stasis, rete testis, right				
mild	0/14	0/15	0/15	[2/14]
- sperm stasis, rete testis, left				
mild	1/14	0/15	0/15	[1/14]

Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Histopathology (Incidence) – Recovery, Continued				
Testis/Seminiferous Tubules, Continued				
- sperm granuloma, rete testis, right				
moderate	0/14	0/15	0/15	[1/14]
- dilation, tubular, right				
mild	0/14	0/15	0/15	[2/14]
- dilation, tubular, left				
mild	0/14	0/15	0/15	[2/14]
- mineralization, tubular, right				
minimal	0/14	0/15	0/15	[1/14]
Sperm Evaluation - Main				
Sperm density (mean No. of sperm per g of cauda epididymis tissue)	1898.20	1709.31	1668.56	[1393.73]
Sperm motility (vas deferens)	-	-	-	-
Sperm Evaluation – Recovery	-	-	-	-

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Reproductive Parameters – First Mating (Cohabitation initiated SD 64, on the day of the 10th dose)				
No. Females Cohabitated	29	31	30	29
No. Females Mated	29	30	30	29
No. Pregnant Females	28	27	29	24
No. Nonpregnant Females	1	3	1	5
Mating Index (%)	100	96.8	100	100
Pregnancy Index (%)	96.6	87.1	96.7	[82.8]
Fertility Index (%)	96.6	90.0	96.7	[82.8]
No. Days Prior to Mating	2.7	2.6	2.7	2.7
Mean No. Corpora lutea/pregnant female	17.8	19.7	17.5	19.4
Mean No. Implantations/pregnant female	15.8	16.7	14.9	16.5
Mean No. Dead embryos/pregnant female	0.8	0.6	0.9	1.0
Mean No. Live embryos/pregnant female	15.0	16.1	14.0	15.5
Mean % Preimplantation loss (Litter Mean)	9.73	12.67	14.15	11.93
Mean % Postimplantation loss (Litter Mean)	4.91	3.76	6.17	5.97

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.3	3	30
Number of Males – Total	30	30	30	30
Number of Males – SD 86-89 (Main)	15	15	15	15
Number of Males – SD 198-201 (Recovery)	15	15	15	15
Number of Untreated Females – First Mating	29	30	30	29
Number of Untreated Females – Recovery Mating	16	15	18	16
Noteworthy Findings, Continued				
Reproductive Parameters – Recovery Mating (Cohabitation initiated after 13 weeks of recovery)				
No. Females Cohabitated	14	15	15	14
No. Females Mated	14	15	15	13
No. Pregnant Females	12	14	13	11
No. Nonpregnant Females	2	1	2	2
Mating Index (%)	100	100	100	92.9
Pregnancy Index (%)	85.7	93.3	86.7	78.6
Fertility Index (%)	85.7	93.3	86.7	84.6
No. Days Prior to Mating	3.9	3.1	2.6	3.5
Mean No. Corpora lutea/pregnant female	17.8	17.1	17.5	18.3
Mean No. Implantations/pregnant female	15.3	15.3	15.8	14.5
Mean No. Dead embryos/pregnant female	1.0	0.9	0.9	0.8
Mean No. Live embryos/pregnant female	14.3	14.4	14.9	13.7
% Preimplantation loss (Litter Mean)	12.65	10.04	10.20	18.18
% Postimplantation loss (Litter Mean)	6.78	6.77	6.67	5.39

(footnotes presented on following page)

C Confidential

2.6.7.12.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7840 [4.2.3.5.1.1: TT[redacted]7840]（続き）

- =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; NE=not evaluated; No.=number; Q1W=once weekly; SD=study day; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# = number affected/number examined; *p≤0.05.; **p≤0.01.
Mating Index = [Mated females/females cohabited] × 100.
Fertility Index = [Pregnant females/mated females] × 100.
Pregnancy Index = [Pregnant females/females cohabited] × 100.
% Preimplantation loss = [(No. of corpora lutea – No. of implantations)/(No. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss = [(No. of resorptions + No. of dead fetuses)/(No. of implantations)] × 100.

a ADA positive incidence.

b One male in the control group was found dead prior to dose administration on SD 64. One male in the 30 mg/kg group was euthanized after dose administration on SD 36 due to adverse clinical signs (hunched posture, limited use of the right hindpaw, and a swollen right hindpaw). One male in the 30 mg/kg group was found dead on SD 148. Unscheduled deaths were not examined histomorphologically.

c For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

C Confidential

2.6.7.12.B 雌ラットを用いた皮下投与による受胎能及び初期胚発生に関する試験（TT #[redacted]-7863）

Test Article: Sotatercept

Design Similar to ICH 4.1.1? Yes
Species / Strain: Rat / Crl:CD(SD)
Initial Age: 8 weeks at receipt
Date of First Dose: [redacted]
Day of Mating: GD 0
Day of Cesarean-Section: GD 13
Method of Administration: Subcutaneous Injection Q1W
Dosing Volume: 1 mL/kg
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Study Number: TT #[redacted]-7863
Location in CTD: [4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]
GLP Compliance: Yes[a]

Special Features: Immunogenicity (ADA) evaluation predose and at termination
Treatment Interval (Females for fertility assessment): 14 days prior to cohabitation, during cohabitation, and through GD 7
Treatment Interval (Females for toxicokinetic sampling): 15 days
Treatment Interval (Males): None
No-Observed-Effect Level: 5 mg/kg Q1W (maternal toxicity, female fertility, and early embryonic developmental parameters)
No-Observed-Adverse-Effect Level: 15 mg/kg Q1W (maternal toxicity); 5 mg/kg Q1W (female fertility and early embryonic developmental parameters)

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	30	30	30
Number of Females – Main	25	25	25	25
Number of Females – Toxicokinetics	3	5	5	5
Number of Untreated Males	25	25	25	25
Toxicokinetics – Study Day 1 (After 1st dose)				
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	BLQ	2735	12,300	28,761
C_{max} (µg/mL)	BLQ	24.8	108	268
Toxicokinetics – Study Day 15 (After 3rd dose)				
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)[b]	BLQ	NR	NR	NR
C_{max} (µg/mL)	BLQ	106	165	211

Confidential

2.6.7.12.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7863 [4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	30	30	30
Number of Females – Main	25	25	25	25
Number of Females – Toxicokinetics	3	5	5	5
Number of Untreated Males	25	25	25	25
Immunogenicity (Incidence ADA positive) – Overall by Termination	0/28	14/30	12/30	6/30
Noteworthy Findings - Females				
Mortality	0	0	0	[2][c]
Premating and Mating Clinical Observations	-	-	-	-
Gestation Clinical Observations[d]				
Swelling, hind limb/left	0/0	0/0	0/0	[18/4]
Swelling, hind limb/right	0/0	0/0	0/0	[16/4]
Premating Body Weight (%)[e]				
SD 8	267.6 g	1.8	[2.6]	[4.9**]
SD 15	278.1 g	2.7	[4.4*]	[7.7**]
Gestation Body Weight	-	-	-	-

2.6.7.12.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7863 [4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	30	30	30
Number of Females – Main	25	25	25	25
Number of Females – Toxicokinetics	3	5	5	5
Number of Untreated Males	25	25	25	25
Noteworthy Findings – Females, Continued				
Premating Body Weight Change (%)[e]				
SD 8 to 11	3.0 g	70.0	[166.7**]	[166.7**]
SD 1 to 15	22.4 g	22.3	[50.9**]	[82.6**]
Gestation Body Weight Change	-	-	-	-
Premating Food Consumption (%)[e]				
SD 1 to 4	19.9 g/animal/day	5.5	[8.5*]	[7.0]
SD 8 to 11	21.5 g/animal/day	4.7	[10.2**]	[13.0**]
SD 1 to 15	21.9 g/animal/day	0.9	[8.7**]	[10.0**]
Gestation Food Consumption	-	-	-	-
Reproductive Parameters				
No. Females Cohabitated	25	25	25	25
No. Females Mated	24	25	24	21
No. Pregnant Females	24	23	[20]	[9]
No. Nonpregnant Females	1	2	5	16

Confidential

2.6.7.12.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7863 [4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	30	30	30
Number of Females – Main	25	25	25	25
Number of Females – Toxicokinetics	3	5	5	5
Number of Untreated Males	25	25	25	25
Noteworthy Findings – Females, Continued				
Reproductive Parameters (Mean Values), Continued				
No. With Total Resorption of Litter	0	0	[1]	[2]
Mean Mating Index (%)	96	100	96	[84]
Fecundity Index (%)	100	92	[83]	[43*]
Fertility Index (%)	96	92	[80]	[36]
Estrous Cycles Lengths (days)	4.6	4.8	4.6	[6.7**]
No. of Estrous Cycles (count)	2.4	2.4	2.5	[1.7*]
No. Days Prior to Mating	3.4	3.0	3.3	3.8
No. Corpora lutea/pregnant female	17.4	16.4	18.0	17.3
No. Implantations/pregnant female	16.3	[14.5]	[14.1*]	[13.1*]
No. Resorptions/pregnant female (LM)	0.7	0.8	[2.2]	[2.5]
No. Live embryos/pregnant female	15.6	[13.7*]	[11.9*]	[10.6]
% Preimplantation loss (LM)	5.83	10.14	[17.04*]	[12.47]
% Postimplantation loss (LM)	4.27	5.96	[20.41]	[28.40]

C Confidential

2.6.7.12.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7863 [4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	30	30	30
Number of Females – Main	25	25	25	25
Number of Females – Toxicokinetics	3	5	5	5
Number of Untreated Males	25	25	25	25
Noteworthy Findings – Females, Continued				
Gross Pathology[f]				
Adrenal glands				
- discoloration, green	0/25	1 (2)/25	0/25	0/25
- discoloration, red	0/25	0/25	[1 (2)/25]	[4 (2.5)/25]
- discoloration, tan	0/25	0/25	[4 (2.8)/25]	[4 (3)/25]
- discoloration, yellow	0/25	1 (2)/25	0/25	0/25
- enlarged	0/25	1 (2)/25	[1 (2)/25]	[6 (2.8)/25]
Organ Weights (%)[e]				
Gravid uterine weight with cervix (%)	8.74 g	[-14**]	[-21*]	[-31][g]
Gravid uterine weight with cervix / body weight (%)	2.6029 g	[-15**]	[-24**]	[-34*][g]
Histopathology	-	-	-	-

(footnotes presented on following page)

C Confidential

2.6.7.12.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7863 [4.2.3.5.1.2: TT[redacted]7863]（続き）

- =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); $AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification (0.00098 µg/mL); C_{max}=observed maximum concentration; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; LM=litter mean; NA=not applicable; No.=number; NR=not reported; Q1W=once weekly; SD=study day; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# = number affected/number examined; * p<0.05; **p<0.01.
Mating Index=[Mated females/females cohabited] × 100.
Fecundity Index=[Pregnant females/mated females] × 100.
Fertility Index=[Pregnant females/females cohabited] × 100.
% Preimplantation loss=[(No. of corpora lutea – No. of implantations)/(No. of corpora lutea)] × 100.
% Postimplantation loss=[(No. of resorptions + No. of dead fetuses)/(No. of implantations)] × 100.

a GLP with the exception that TK analysis was done using non-GLP software.

b $AUC_{0\text{-}168h}$ data from SD 15 (after the 3 rd dose) are not reported due to these values being calculated incorrectly in the toxicokinetic report. See Note to File for TT #[redacted]-7863.

c Two females in the 50 mg/kg group (Animal Numbers [redacted] and [redacted]) were euthanized in extremis on GD 5 and 8, respectively. Both animals were observed with moderate to severe edema on the hind limbs and significant impaired mobility. Treatment related gross pathology findings for consisted of enlarged and red adrenal glands and moderately to severely swollen hind limbs. Animal number [redacted] was also observed with red fluid in the thoracic cavity, but as there were no signs of respiratory distress, this finding is not considered treatment related.

d GD 0 to 13. Reported as No. of Times Observed/Total No. of Animals Affected.

e For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls are shown.

f Values represent incidence and (average) severity grade. The average severity grade, based on a subjective assessment and semi quantitative 4-point scale, equals the sum of the grades for affected tissues divided by the number of affected tissues; 1=minimal, 2=mild, 3=moderate, and 4=severe.

g Several 50 mg/kg dose group animals were excluded from statistical analysis.

C Confidential

2.6.7.13 生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験）

2.6.7.13.A ラットを用いた皮下投与による発生毒性試験（サテライト群でのトキシコキネティクス評価を含む）（TT #[redacted]-7913）

Test Article: Sotatercept

Design Similar to ICH 4.1.3? Yes
Species / Strain: Rat / Crl:CD(SD)
Initial Age: ~66 days at receipt
Date of First Dose: [redacted]
Special Features: Toxicokinetics on GD 6 and 13; Immunogenicity (ADA) evaluation on GD 5 (predose) and 21
Treatment Interval: GD 6 and 13
Day of Mating: GD 0
Day of Cesarean-Section: GD 21
Method of Administration: Subcutaneous injection on GD 6 and 13
Dosing Volume: 1 mL/kg
Vehicle/Formulation: Phosphate buffered saline, pH 7.4
Study Number: TT #[redacted]-7913
Location in CTD: [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913]
GLP Compliance: Yes
No-Observed-Effect Level: 15 mg/kg (maternal toxicity); <5 mg/kg (developmental toxicity)
No-Observed-Adverse-Effect Level: 50 mg/kg (maternal toxicity); 5 mg/kg (developmental toxicity)

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	28	28	28
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	22	22	22	22
Number of Females – Toxicokinetics	6	6	6	6
Maternal Toxicokinetics (GD 6, after 1st dose)				
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	-	6337	11,897	20,002
C_{max} (µg/mL)	-	46.6	91.6	153.6
Maternal Toxicokinetics (GD 13, after 2nd dose)				
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	-	2642	5088	19,885
C_{max} (µg/mL)	-	NR	NR	NR
Immunogenicity (Incidence of ADA Positive) – Overall by Termination	5/21	17/26	16/27	19/28

Confidential

2.6.7.13.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7913 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	28	28	28
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	22	22	22	22
Number of Females – Toxicokinetics	6	6	6	6
Noteworthy Findings				
Mortality	0	0	0	1[a]
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight (g)				
GD 21 (Mean Values)	416.1	422.8	411.9	397.3
Body Weight Gain (g)				
GD 0 to 21 corrected (GD 21 body weight minus the gravid uterine weight) (Mean Values)	+89.3	+95.7	+88.9	+90.2
GD 18 to 21 (Mean Values)	60.4	57.6	53.4	[40.4**]
Food Consumption (%)[b]				
GD 18 to 21 (Mean Values)	27.8 g	-1.1	-4.7	[-7.9**]
Terminal Maternal Body Weight	-	-	-	-
Gravid Uterine Weight (%)[b]	99.1 g	0.2	-3.7	[-20.6**]
Gross Examination[c]	-	-	-	-
Reproductive Parameters (Mean Values)				
No. Pregnant	21	20	19	21
No. Nonpregnant	1	2	3	1
No. Litters evaluated	21	20	19	21

Confidential

2.6.7.13.A 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7913 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	28	28	28
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	22	22	22	22
Number of Females – Toxicokinetics	6	6	6	6
Noteworthy Findings (continued)				
Reproductive Parameters (Mean Values), Continued				
No. of Dams with All Conceptuses Dead or Resorbed	0	0	0	[1]
No. of Fetuses Evaluated (Live/Dead)	272 / 0	273 / 1	256 / 0	212 / [3]
No. Corpora lutea	15.5	15.7	14.6	14.8
No. Implantations	14.2	14.2	14.2	13.8
No. Resorptions	1.2	0.4	0.7	[3.6*]
No. Early resorptions	1.2	0.4	0.4	1.0
No. Late resorptions	0.0	0.0	0.3	[2.6**]
Litter Sizes	13.0	13.7	13.5	[10.2*]
Live fetuses	13.0	13.6	13.5	[10.1*]
Dead fetuses	0.0	0.0	0.0	[0.1]
% Preimplantation loss	7.4	8.5	2.7	6.3
% Postimplantation loss	8.8	3.4	5.0	[27.9*]
Fetal sex ratios (% Live Males /Litter)	48.0	54.0	47.6	44.3

C Confidential

2.6.7.13.A 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7913 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	28	28	28
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	22	22	22	22
Number of Females – Toxicokinetics	6	6	6	6
Noteworthy Findings (continued)				
Live Fetal Body Weights (%)[b]				
Litter	5.66 g	[-8.8**]	[-14.8**]	[-21.6**]
Females	5.47 g	[-9.3**]	[-14.1**]	[-20.5**]
Males	5.87 g	[-9.7**]	[-15.8**]	[-21.3**]
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined[d]	4 (0) / 272 (0)	0 (0) / 273 (1)	0 (0) / 256 (0)	0 (0) / 212 (3)
Fetal Morphology (Mean Values)				
Number of Fetuses Evaluated (Live/Dead)	272 / 0	273 / 1	256 / 0	212 / 3
External examination	-	-	-	-
Number of Fetuses Evaluated (Live/Dead)	130 / 0	132 / 0	122 / 0	98 / 3
Visceral examination	-	-	-	-
Coronal examination	-	-	-	-

C Confidential

2.6.7.13.A 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7913 [4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7913]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Number of Females – Total	28	28	28	28
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	22	22	22	22
Number of Females – Toxicokinetics	6	6	6	6
Noteworthy Findings (continued)				
Fetal Morphology, Continued				
Number of Fetuses Evaluated (Live/Dead)	124 / 0	141 / 1	134 / 0	114 / 0
Skeletal examination				
Ossification Sites (Mean Values)				
- lumbar vertebrae	5.85	5.87	5.77	[5.62*][e]
- thoracic vertebrae	13.14	13.12	13.22	[13.38**][e]
- hindlimbs: metatarsals	4.89	4.88	[4.62**]	[4.42**]
- hindlimbs: phalanges	6.65	6.74	5.98	[5.34**]
- ribs (pairs)	13.09	13.09	13.17	[13.32*][e]

- =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); $AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; C_{max}=observed maximum concentration; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; No.=number; NR=not reported; Q1W=once weekly; SD=study day; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# = number affected/number examined; *p<0.05; **p<0.01.

% Preimplantation loss=[(No. of corpora lutea – No. of implantations)/(No. of corpora lutea)] × 100.

% Postimplantation loss=[(No. of resorptions + No. of dead fetuses)/(No. of implantations)] × 100.

a One female in the 50 mg/kg group assigned to the toxicokinetic portion of the study aborted on GD 15 and was subsequently euthanized. Adverse clinical signs included decreased motor activity, red perivaginal substance, red substance in the cage pan, red discolored fur on the nose and pale extremities on the day of abortion, and sparse hair coat on the limbs from GD 12 to 15. All tissues appeared normal at necropsy.

b For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls are shown.

c Limited to examination of the thoracic, abdominal, and pelvic viscera.

d Number in ( ) represents placentas from dead fetuses.

e The lumbar vertebrae, thoracic vertebra, and ribs (pairs) ossification findings at 50 mg/kg Q1W reflected increases in the incidence of related variations (supernumerary thoracic ribs with associated significant increases and decreases in the numbers of thoracic and lumbar vertebrae, respectively).

C Confidential

2.6.7.13.B ウサギを用いた週1回皮下投与による GLP 適用の胚・胎児発生毒性試験（TT #[redacted]-7841）

Test Article: Sotatercept

Design Similar to ICH 4.1.3? Yes
Species / Strain: Rabbit / New Zealand White
Initial Age: 4-6 months at receipt
Date of First Dose: [redacted]
Special Features: Toxicokinetics on GD 7 and 14; Immunogenicity (ADA) evaluation on GD 6, 14, and 29
Treatment Interval: GD 7 and 14
Day of Mating: GD 0
Day of Cesarean-Section: GD 29
Method of Administration: Subcutaneous injection on GD 7 and 14
Dosing Volume: 1 mL/kg
Vehicle/Formulation: [redacted]
Study Number: TT #[redacted]-7841
Location in CTD: [4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841]
GLP Compliance: Yes
No-Observed-Effect Level: 5 mg/kg (maternal toxicity); 0.5 mg/kg (developmental toxicity)
No-Observed-Adverse-Effect Level: 5 mg/kg (maternal toxicity); 0.5 mg/kg (developmental toxicity)

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Number of Females – Total	23	23	23	23
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Number of Females – Toxicokinetics	3	3	3	3
Maternal Toxicokinetics (GD 7, after 1st dose)				
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	BLQ	686	1880	5150
C_{max} (µg/mL)	BLQ	5.23	13.7	40.7
Maternal Toxicokinetics (GD 14, after 2nd dose)				
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	BLQ	796	1630	7800
$AUC_{0\text{-}366h}$ (µg· hr/mL)	BLQ	1070	1780	10,900
C_{max} (µg/mL)	BLQ	6.89	17.6	61.5

Confidential

2.6.7.13.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7841 [4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Number of Females – Total	23	23	23	23
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Number of Females – Toxicokinetics	3	3	3	3
Immunogenicity (Incidence of ADA Positive) – Overall by Termination	1/23	10/23	10/23	8/23
Noteworthy Findings				
Mortality	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Body Weight Change (%)	-	-	-	-
Food Consumption (%)	-	-	-	-
Gross Examination[a]	-	-	-	-
Reproductive Parameters (Mean Values)				
No. Pregnant	20	19	19	19
No. Nonpregnant	0	1	1	1
No. Litters evaluated	20	19	19	19
No. Corpora lutea	11.3	11.8	11.9	11.0
No. Implantations	10.5	9.7	11.3	9.4
No. of Resorptions	0.5	0.8	0.9	[1.7]
No. of Early Resorptions	0.3	0.4	0.6	[0.7]
No. of Late Resorptions	0.3	0.4	0.4	[1.0]

C Confidential

2.6.7.13.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7841 [4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Number of Females – Total	23	23	23	23
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Number of Females – Toxicokinetics	3	3	3	3
Noteworthy Findings, Continued				
Reproductive Parameters (Mean Values), Continued				
No. of Dead fetuses	0	0.1	0	0
No. Live fetuses/pregnant female	10.0	8.8	10.3	[7.7*]
% Preimplantation loss	7.51	18.56*	5.80	13.15
% Postimplantation loss	5.29	8.65	8.02	[17.22]
Fetal sex ratios (% Live Males/Litter)	54.55	50.64	52.67	54.49
Live Fetal Body Weights (%)[b]				
Litter	41.74 g	-0.98	[-12.5*]	[-18.3**]
Females	40.37 g	1.9	[-11.0]	[-15.6**]
Males	42.82 g	-4.0	[-13.6**]	[-20.2**]
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined[c]	0 (0) / 199 (0)	0 (0) /166 (2)	0 (0) / 196 (0)	0 (0) / 146 (0)
Fetal Morphology [Number of Fetuses Evaluated (Live/Dead)]	199 / 0	168 / 2	196 / 0	146 / 0
External examination	-	-	-	-
Visceral examination	-	-	-	-
Coronal examination	-	-	-	-

C Confidential

2.6.7.13.B 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7841 [4.2.3.5.2.3: TT[redacted]7841]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	5
Number of Females – Total	23	23	23	23
Number of Females – Scheduled for Cesarean-Section	20	20	20	20
Number of Females – Toxicokinetics	3	3	3	3
Noteworthy Findings, Continued				
Fetal Morphology, Continued				
Skeletal examination				
Ossification Sites (mean values)				
- metacarpals	4.99	4.93	4.96	[4.86**]
- forelimb phalanges	13.98	13.93	13.92	[13.48**]
- hindlimb phalanges	12.00	12.00	12.00	[11.92*]

- =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); $AUC_{0\text{-}Xh}$=area under the concentration-time curve from time 0 to X hours; BLQ=below limit of quantification (<0.04 µg/mL); C_{max}=observed maximum concentration; CTD=common technical document; GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; ICH=International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; No.=number; SD=study day; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# = number affected/number examined; *p≤0.05; **p≤0.01.

% Preimplantation loss=[(No. of corpora lutea – No. of implantations)/(No. of corpora lutea)] × 100.

% Postimplantation loss=[(No. of resorptions + No. of dead fetuses)/(No. of implantations)] × 100.

a Limited to examination of the thoracic, abdominal, and pelvic viscera.

b For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls are shown.

c Number in ( ) represents placentas from dead fetuses.

C Confidential

2.6.7.14 生殖発生毒性試験（出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験）ーラットを用いた皮下投与による GLP 適用の発生及び出生前／出生後の生殖に関する試験（出生後の行動／機能評価を含む）（TT #[redacted]-7830）

Test Article: Sotatercept

Design Similar to ICH 4.1.2? Yes
Species / Strain: Rat / Crl:CD(SD)
Initial Age: ~59-77 days at receipt
Date of First Dose: [redacted]
Day of Mating: GD 0
Treatment Interval (F_0 generation):
Gestation group: GD 6 and 13 (saline doses on LD 1, 8, and 15)
Lactation group: LD 1, 8, and 15 (saline doses on GD 6 and 13)
Special Features: Due to impact of ADA on exposure rats were either dosed during gestation or lactation but not both. Immunogenicity (ADA) evaluation predose and on GD 6, LD 1, and LD 21.

Method of Administration: Subcutaneous injection Q1W
Dosing Volume: 1 mL/kg
Vehicle/Formulation: [redacted]
Litters Culled/Not Culled: Culled to 1 pup/sex/litter on PND 21

Study Number: TT #[redacted]-7830
Location in CTD: [4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]
GLP Compliance: Yes

No-Observed-Adverse-Effect Level: 10.0 mg/kg (F_0 maternal and reproductive toxicity when dosed during lactation); 5.0 mg/kg (F_0 maternal and reproductive toxicity when dosed during gestation and F_1 viability and growth when F_0 dams dosed during gestation); 1.5 mg/kg (F_1 viability and growth when F_0 dams dosed during lactation)

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	Gestation 1.5	Gestation 5.0	Lactation 1.5	Lactation 5.0	Lactation 10
Number of Animals - F_0 Generation						
Total No. of Mated Females	22	22	22	22	22	22
Total No. of Pregnant Females	22	22	22	21	20	21
No. of Females Designated for Parturition	22	22	22	22	22	22
Immunogenicity (Incidence of ADA Positive) – Gestation Group Overall by LD 21	2/22	7/22	16/22	NA	NA	NA
Immunogenicity (Incidence of ADA Positive) – Lactation Groups Overall by LD 21	NA	NA	NA	4/21	7/20	3/21

C Confidential

2.6.7.14 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7830 [4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	Gestation 1.5	Gestation 5.0	Lactation 1.5	Lactation 5.0	Lactation 10
Number of Animals - F_0 Generation						
Total No. of Mated Females	22	22	22	22	22	22
Total No. of Pregnant Females	22	22	22	21	20	21
No. of Females Designated for Parturition	22	22	22	22	22	22
Noteworthy Findings - F_0 Generation						
Mortality	0	0	0	0	0	0
Clinical Observation	-	-	-	-	-	-
Body Weight Change	-	-	-	-	-	-
Food Consumption						
Gestation (%)	-	-	-	-	-	-
Lactation (%) – LD 10 to 15[a]	71.6 g	-0.9	-5.9	-2.7	-8.8	[-14.8**]
Mean Length of Gestation (days)	21.4	21.1	21.2	21.2	21.2	21.2
Gestation Index (%)	100	100	100	100	100	100
Abnormal Parturition	-	-	-	-	-	-
Uterine Examination	-	-	-	-	-	-
Ovarian Examination	-	-	-	-	-	-
Gross Examination (LD 21)[b]	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.14 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7830 [4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	Gestation 1.5	Gestation 5.0	Lactation 1.5	Lactation 5.0	Lactation 10
Noteworthy Findings – F_1 Generation, Preweaning						
Number of Pregnant Females	22	22	22	22	22	22
Females Failing to Initiate/Complete Parturition	0	0	0	1	2	1
Females with Live Pups (LD 0)	22	22	22	21	20	21
Number of Implantations/Pregnant Female	12.5	12.7	12.1	12.8	12.8	13.1
Total Pups Delivered	256	267	247	257	242	261
Live Pups/Litter (PND 0)	11.6	12.0	11.0	12.0	11.9	12.4
Dead Pups on PND 0 (% LM)	0.0	1.05	1.79	1.60	2.14	0.0
% Postimplantation Survival	93.85	95.45	92.60	95.67	94.86	94.08
Fetal Sex Ratios	50.5	47.6	56.7	48.7	45.8	49.1
Surviving Pups per Litter	-	-	-	-	-	-
Live Litter Size at Weighing	-	-	-	-	-	-
Viability Index (%)	98	98	97	98	98	99
Lactation Index (%)	99	100	100	100	100	100

Confidential

2.6.7.14 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7830 [4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	Gestation 1.5	Gestation 5.0	Lactation 1.5	Lactation 5.0	Lactation 10
Noteworthy Findings – F_1 Generation, Preweaning (Mean Values), Continued						
Live Pup Weights (%) (female) (LM)[a]						
PND 1	7.16 g	[-12**]	[-9.2**]	-1.3	-2.2	-1.5
PND 10	19.58 g	-0.50	6.1	-4.2	-3.7	[-9.8*]
PND 15	29.83 g	-1.0	5.9	-4.3	-5.3	[-13**]
PND 18	35.66 g	-1.3	5.3	-4.8	-6.1	[-14**]
PND 21	47.56 g	-4.3	1.8	-7.1	[-9.2]	[-18**]
Live Pup Weights (%) (male) (LM)[a]						
PND 1	7.64 g	[-13**]	[-8.9*]	-4.2	-2.2	-1.0
PND 8	17.05 g	-5.7	0.76	-7.4	-7.2	[-9.3*]
PND 10	20.68 g	-2.9	4.3	-7.0	-6.7	[-11*]
PND 15	31.63 g	-4.0	4.1	-7.6	[-9.4*]	[-15**]
PND 18	37.64 g	-4.1	3.6	-7.3	[-9.5*]	[-16**]
PND 21	50.05 g	-6.8	1.4	-9.7	[-13**]	[-20**]
Clinical Signs	-	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.14 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7830 [4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	Gestation 1.5	Gestation 5.0	Lactation 1.5	Lactation 5.0	Lactation 10
Noteworthy Findings – F_1 Generation, Postweaning (Mean Values)						
Number of Animals (females/males)	22/21	22/22	22/22	22/22	22/22	22/22
Mortality	1	0	0	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%)[a]						
Premating Females – PND 92	301.6 g	-6.3*	-1.3	-7.2*	[-5.0]	[-10.2**]
Gestation Females – GD 13	377.0 g	-3.3	-1.9	-3.9	-3.3	[-7.7**]
Male – PND 106	588.9 g	-3.8	-1.6	-4.2	[-11**]	[-16**]
Body Weight Gain (%)[a]						
Premating Females – PND 22-92	249.0 g	-6.8	-2.2	-7.3	[-4.1]	[-8.4*]
Gestation Females – Gestation	-	-	-	-	-	-
Males - PND 22-106	532.8 g	-3.6	-1.7	-3.6	[-11**]	[-15**]
Vaginal Opening (days)	31.7	31.1	31.0	31.9	32.5	[34.1**]
Preputial Separation (days)	42.9	42.8	44.2	45.0	[46.0**]	[46.4**]
Behavioral Tests						
Sensory Function	-	-	-	-	-	-
Motor Activity	-	-	-	-	-	-
Learning and Memory	-	-	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.14 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7830 [4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)	Gestation 1.5	Gestation 5.0	Lactation 1.5	Lactation 5.0	Lactation 10
Noteworthy Findings – F_1 Generation, Postweaning (Mean Values), Continued						
Number of Animals (females/males)	22/21	22/22	22/22	22/22	22/22	22/22
Noteworthy Findings – F_1 Generation, Reproductive Performance						
No. of Females Cohabited	22	22	22	22	22	22
No. of Males Cohabited	21	22	22	22	22	22
No. Females Bred	22	22	21	22	22	22
No. Pregnant Females	20	20	20	22	22	19
No. Nonpregnant Females	2	2	2	0	0	3
No. Females Not Bred	0	0	1	0	0	0
Mean No. Days Prior to Mating	2.6	1.9	2.7	2.6	2.5	2.8
No. Corpora lutea/pregnant female	17.8	17.9	17.2	18.2	18.5	17.0
No. Implantations/pregnant female	16.6	16.3	15.3	16.8	16.6	15.0
No. Dead fetuses/pregnant female	0.7	0.6	1.0	0.9	0.9	0.5
Litter Sizes (Mean)						
Viable Embryos	15.9	15.8	14.3	15.9	15.8	14.5
Nonviable Embryos	0.7	0.6	1.0	0.9	0.9	0.5
% Preimplantation loss	6.03	7.65	12.06	6.66	9.77	10.62
% Postimplantation loss	4.57	3.48	6.09	5.41	5.08	4.02

(footnotes presented on following page)

Confidential

2.6.7.14 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7830 [4.2.3.5.3.1: TT[redacted]7830]（続き）

– =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); CTD=common technical document; GD=gestation day; ICH=International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; LD=lactation day; LM=litter mean; NA=not applicable; No.=number; PND=postnatal day; Q1W=once weekly; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; *p≤0.05; **p≤0.01.

Fetal sex ratio=[Total no. live male fetuses/(total No. live female fetuses + total No. live male fetuses)] × 100.

% Preimplantation loss=[(No. of corpora lutea – No. of implantations)/(No. of corpora lutea)] × 100.

% Postimplantation loss=[(No. of implantations – No. of live embryos)/(No. of implantations)] × 100.

% Postimplantation survival=100 - % Postimplantation Loss/Litter.

a For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls are shown.

b Limited to examination of the thoracic, abdominal, and pelvic viscera.

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験（幼若動物を用いた試験）－幼若ラットを用いた回復期間を伴う13週間皮下投与毒性試験（TT #[redacted]-7864）

Test Article: Sotatercept

Species / Strain: Rat / Crl:CD(SD)
Initial Age: 7 days (PND 7)
Date of First Dose: [redacted] (toxicokinetics/immune assessment phases); [redacted] (main study)
Dose Volume: 1 ml/kg
Method of Administration: Subcutaneous injection Q1W

Duration of Dosing: PND 7-91 (13 weeks) (total of 13 doses)
Necropsy: PND 98 (main animals); GD 15 or PND 233 (recovery animals)
Duration of Postdose: 18 weeks
Vehicle/Formulation: [redacted] in sterile water for injection, USP, [redacted]

Study Number: TT #[redacted]-7864
Location in CTD: [4.2.3.5.4.2: TT [redacted]7864]
GLP Compliance: Yes[a]

Special Features: Toxicokinetics on PND 7 and 91, immunogenicity (ADA) evaluation analysis on PND 98 and GD 15/PND 233, immunophenotyping assessment on PND 63, TDAR assessment on PND 48, 63, 224, and 239

No-Observed-Adverse-Effect Level: <1 mg/kg Q1W for F_0 male and female systemic toxicity; <1 mg/kg Q1W F_0 male and 10 mg/kg Q1W female for reproductive toxicity; <1 mg/kg Q1W F_0 male and 1 mg/kg Q1W female for developmental and neurobehavioral development; and 10 mg/kg Q1W for F_1 embryonic toxicity

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Toxicokinetics – PND 7[b]								
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	BLQ	BLQ	598	606	1780	1730	6540	6200
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	4.83	4.82	18.2	16.4	55.5	53.6
Toxicokinetics – PND 91[b]								
$AUC_{0\text{-}168h}$ (µg· hr/mL)	BLQ	BLQ	2900	3270	4940	5100	16,000	12,200
C_{max} (µg/mL)	BLQ	BLQ	20.2	22.0	33.8	34.2	118	81.3

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Immunogenicity (ADA Positive Incidence) – Overall by PND 98	-	-	1/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Immunogenicity (ADA Positive Incidence) – Overall by GD15/PND233	-	-	1/20	0/20	0/20	0/20	2/20	0/20
Noteworthy Findings								
Mortality – Main, Recovery, & Immunotoxicity Animals[d]	2	4	1	1	1	3	2	3
Mortality – Toxicokinetic Animals[e]	0	0	0	0	1	0	1	0
Clinical Observations – Main (total incidence/number of animals affected)								
Impaired use of left hindlimb	0/0	0/0	19/4	0/0	5/1	11/2	[63/7]	[15/4]
Impaired use of right hindlimb	0/0	0/0	4/2	0/0	0/0	7/2	[45/7]	[45/5]
Swollen left hindlimb	0/0	0/0	26/4	1/1	9/1	18/2	[67/8]	[22/5]
Swollen right hindlimb	0/0	0/0	7/2	0/0	1/1	13/2	[45/8]	[53/5]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Observations – Recovery (total incidence/number of animals affected)								
Impaired use of left hindlimb	0/0	0/0	0/0	7/2	0/0	12/3	[30/5]	[68/5]
Impaired use of right hindlimb	0/0	0/0	1/1	5/1	0/0	4/1	[68/6]	[51/4]
Swollen left hindlimb	0/0	0/0	12/3	19/2	0/0	27/3	[38/7]	[83/5]
Swollen right hindlimb	0/0	0/0	5/1	9/1	3/1	4/1	[84/7]	[83/8]
Body Weight (%) – Main (PND 91)[f]	-	549.0 g	-	[-9.2**]	-	[-12.7**]	-	[-18.0**]
Body Weight (%) – Recovery (PND 203)[f]	-	727 g	-	[-5.1]	-	[-9.2*]	-	[-11.8**]
Gestation Body Weight (%) (GD 15)	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Food Consumption (g/animal/day) (PND 28-91)	-	28.3	-	[26.6**]	-	[26.2**]	-	[25.3**]
Food Consumption (g/animal/day) (PND 91-203)	-	30	-	[28]	-	[28*]	-	[27**]
Gestation Food Consumption (g/animal/day) (GD 0-15)	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Vaginal Patency / Balanopreputial Separation (PND)	32.5	45.7	33.3	[47.5*]	[34.8**]	[48.7**]	[34.8**]	[50.4**]

2.6.7.15 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT [redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
FOB Assessments[g]								
Home Cage Observations (PND 61)	-	-	-	-	-	-	-	-
Home Cage Observations (PND 172)	-	-	-	-	-	-	-	-
Handling Observations (PND 61)	-	-	-	-	-	-	-	-
Handling Observations (PND 172)	-	-	-	-	-	-	-	-
Open Field Observations (PND 61)	-	-	-	-	-	-	-	-
Open Field Observations (PND 172)	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensory Observations (PND 61)	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensory Observations (PND 172)	-	-	-	-	-	-	-	-
Neuromuscular Observations (PND 61)								
- hindlimb grip strength (g)	-	734.7	-	672.1	-	[619.5*]	-	[592.3**]
Neuromuscular Observations (PND 172)	-	-	-	-	-	-	-	-
Physiological Observations								
- body weight (g) (PND 61)	-	400.8	-	[356.9**]	-	[350.7**]	-	[332.1**]
- body weight (g) (PND 172)	-	694.3	-	[628.8]	-	[611.8*]	-	[601.8**]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Motor Activity – PND 61	-	-	-	-	-	-	-	-
Motor Activity – PND 172	-	-	-	-	-	-	-	-
Biel Maze Swimming Trials – PND 62	-	-	-	-	-	-	-	-
Biel Maze Swimming Trials – PND 173	-	-	-	-	-	-	-	-
Reproductive Performance (Treated Females / Untreated Males and Untreated Females / Treated Males)								
Mating Index (%)	-	89.5	-	[75.0]	-	[72.2]	-	[75.0]
Fertility Index (%)	-	68.4	-	[45.0]	-	[50.0]	-	[5.0**]
Copulation Index / Conception Index (%)	-	76.5	-	[60.0]	-	[69.2]	-	[6.7**]
Estrous Cycle Length (days) (F_0 Females)	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
Embryonic Data (Mean Values)								
No. of Gravid Females	12	NA	15	NA	13	NA	15	NA
No. of Viable Embryos	13.5	NA	11.8	NA	11.5	NA	12.2	NA
No. of Nonviable Embryos	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
No. of Early Resorptions	2.8	NA	1.9	NA	1.5	NA	1.3	NA
No. of Late Resorptions	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Embryonic Data (Mean Values), Continued								
% Preimplantation Loss	1.3	NA	2.1	NA	0.9	NA	1.9	NA
% Postimplantation Loss	2.8	NA	1.9	NA	1.5	NA	1.3	NA
No. of Implantation Sites	16.3	NA	13.7	NA	13.0	NA	13.5	NA
No. of Corpora Lutea	17.6	NA	15.8	NA	13.9**	NA	15.4	NA
Clinical Pathology								
Hematology and Coagulation – PND 98 Main								
Absolute reticulocyte (thous/µL)	376.9	229.1	[600.8**]	[288.9]	[687.4**]	[430.9**]	[603.2**]	[412.9**]
Fibrinogen (mg/dL)	256	388	277	470	276	440	[383**]	[479]
HCT (%)	41.8	45.1	[49.4**]	[50.3**]	[49.9**]	[50.2**]	[55.9**]	[56.3**]
HDW (g/dL)	2.63	2.76	[2.88**]	[2.93]	[3.00**]	[3.10**]	[3.01**]	[3.08**]
HGB (g/dL)	13.6	14.4	[15.7**]	[15.8*]	[15.7**]	[15.7*]	[17.5**]	[17.5**]
MCH (pg)	18.6	17.9	[17.6**]	[16.8**]	[17.5**]	[17.3*]	[17.2**]	[17.1**]
MCHC (g/dL)	32.4	32.0	[31.7*]	31.5	[31.5**]	31.4	[31.3**]	[31.1]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Pathology, Continued								
Hematology and Coagulation – PND 98 Main, Continued								
MCV (fL)	57.3	-	[55.5*]	-	[55.7]	-	[55.1**]	-
MPV (fL)	5.65	5.75	6.02	6.38	6.37	6.51	[7.32**]	[7.47**]
Platelet (thous/µL)	1120	964	[911*]	[727**]	[846**]	[774*]	[787**]	[661**]
RBC (mil/µL)	7.31	8.03	[8.90**]	[9.41**]	[8.96**]	[9.15**]	[10.13**]	[10.25**]
RDW (%)	13.9	12.2	[15.5*]	[13.1]	[16.3**]	[15.0**]	[16.2**]	[14.7**]
Hematology and Coagulation– PND 233 Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry – PND 98 Main								
Albumin (g/dL)	4.2	3.9	4.2	3.9	4.1	[3.7*]	[3.9]	[3.7*]
ALP (U/L)	54	-	[98**]	-	[98**]	-	[108.0**]	-
BUN (mg/dL)	15.0	15.7	16.1	[20.2]	[20.6]	[20.6]	[24.6*]	[27.8**]
Chloride (mEq/L)	103	101	101	[99*]	[100**]	[99]	[100*]	[99**]
CREA (mg/dL)	0.35	0.35	0.40	0.40	0.41	0.40	0.39	[0.42]

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Pathology, Continued								
Serum Chemistry – PND 98 Main, Continued								
Globulin (g/dL)	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	[2.4]	[2.4]	[2.4]
Phosphorus (mg/dL)	9.7	9.8	10.7	10.3	[11.0*]	10.1	[11.8**]	[11.0]
Total protein (g/dL)	6.8	6.5	6.7	6.4	6.6	[6.1*]	[6.4*]	[6.1]
Serum Chemistry – PND 233 Recovery								
BUN (mg/dL)	-	11.7	-	13.2	-	[36.8][h]	-	[16.4]
Chloride (mEq/L)	-	105	-	105	-	[104][h]	-	105
CREA (mg/dL)	-	0.38	-	0.39	-	[0.94][h]	-	0.37
Phosphorus (mg/dL)	-	8.4	-	8.7	-	[9.6][h]	-	8.9
Urinalysis – PND 98 Main								
Specific gravity	1.029	1.027	1.032	1.029	1.026	1.026	[1.025]	[1.017]
Total volume (mL)	8.4	19.4	12.2	16.0	17.0	15.1	12.6	[27.0]
Incidence of positive urine protein reaction								
- slight to moderate protein present	0/9	1/10	2/10	4/10	[3/10]	[7/10]	[4/10]	[6/9]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Clinical Pathology, Continued								
Urinalysis – PND 98 Main, Continued								
Incidence of positive urine protein reaction, Continued								
- moderate to abundant protein present	0/9	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[3/10]	[1/10]	[2/9]
Urinalysis – PND 233 Recovery								
Specific gravity	1.026	1.040	1.032	1.036	1.023	[1.026*]	1.016	[1.021**]
Total volume (mL)	-	11.0	-	10.4	-	[14.3]	-	[18.7*]
Hormone Analysis – PND 92 (F), PND 97 (M)								
FSH (ng/mL)	11.0	11.9	10.1	10.6	[7.7**]	10.7	[7.0**]	[8.9]
Estradiol (pg/mL)	-	32.33	-	29.04	-	26.69	-	[16.38*]
Hormone Analysis – PND 184 (F), PND 232 (M)	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythropoietin – PND 98 (pg/mL)	6.23	14.04	0.66	67.54	5.61	79.51[i]	29.85	147.70[i]
Erythropoietin – GD 15/PND 233 (pg/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Gross Observations (Incidence) – PND 98 Main								
Epididymides								
- small	NA	0/10	NA	[3/10]	NA	[5/10]	NA	[9/10]
- soft	NA	0/10	NA	0/10	NA	[2/10]	NA	[1/10]
Kidneys								
- dilated pelvis	-	1/10	-	2/10	-	[4/10]	-	[5/10]
- nodule(s)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[3/10]	[1/10]
Testes								
- small	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	[5/10]	NA	[10/10]
- soft	NA	0/10	NA	[3/10]	NA	[9/10]	NA	[10/10]
Gross Observations (Incidence) – PND 233 Recovery								
Epididymides								
- small	NA	0/10	NA	[2/10]	NA	[6/10]	NA	[7/10]
- soft	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	[5/10]	NA	[5/10]

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Gross Observations (Incidence) – PND 233 Recovery, Continued								
Kidneys								
- dilated pelvis	-	0/10	-	[4/10]	-	[3/10]	-	[3/10]
Testes								
- small	NA	0/10	NA	0/10	NA	[2/10]	NA	[3/10]
- soft	NA	0/10	NA	[2/10]	NA	[8/10]	NA	[8/10]
Organ Weights (%) – PND 98 Main[f]								
Epididymis								
Absolute	NA	1.35 g	NA	[-19.3*]	NA	[-44.4**]	NA	[-56.3**]
Relative to body weight ratio	NA	0.244	NA	[-10.2]	NA	[-37.3**]	NA	[-45.9**]
Relative to brain weight ratio	NA	63.027	NA	[-15.1]	NA	[-42.4**]	NA	[-54.4**]
Heart								
Absolute	1.20 g	1.86 g	[-21.7**]	[-28.5**]	[-25.8**]	[-29.6**]	[-18.3**]	[-33.9**]
Relative to body weight ratio	0.397	0.335	[-21.9**]	[-18.8**]	[-21.4**]	[-19.7**]	[-15.9**]	[-18.2**]
Relative to brain weight ratio	61.938	86.982	[-20.2**]	[-24.5**]	[-24.2**]	[-26.9**]	[-17.4**]	[-31.2**]

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Organ Weights (%) – PND 98 Main, Continued[f]								
Ovaries								
Absolute	0.1403 g	NA	[12.8]	NA	[17.6]	NA	[36.0**]	NA
Relative to body weight ratio	0.047	NA	[10.6]	NA	[23.4*]	NA	[40.4**]	NA
Relative to brain weight ratio	7.262	NA	[14.5]	NA	[19.8]	NA	[38.5**]	NA
Prostate								
Absolute	NA	1.14 g	NA	[-27.2**]	NA	[-39.5**]	NA	[-48.2**]
Relative to body weight ratio	NA	0.206	NA	[-18.4**]	NA	[-32.0**]	NA	[-36.4**]
Relative to brain weight ratio	NA	53.194	NA	[-23.2**]	NA	[-37.4**]	NA	[-46.2**]
Testes								
Absolute	NA	3.95 g	NA	-1.3	NA	[-28.9**]	NA	[-53.4**]
Relative to body weight ratio	NA	0.714	NA	8.5	NA	[-20.0**]	NA	[-42.4**]
Relative to brain weight ratio	NA	184.711	NA	3.2	NA	[-26.6**]	NA	[-51.5**]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Organ Weights (%) – PND 233 Recovery[f]								
Epididymis								
Absolute	NA	1.51 g	NA	[-18.5*]	NA	[-37.1**]	NA	[-52.3**]
Relative to body weight ratio	NA	0.210	NA	[-11.0]	NA	[-28.6**]	NA	[-45.2**]
Relative to brain weight ratio	NA	68.107	NA	[-17.1*]	NA	[-35.7**]	NA	[-51.0**]
Heart								
Absolute	1.30 g	2.16 g	[-2.3]	[-19.0**]	[-5.4]	[-11.6]	[-4.6]	[-18.5*]
Relative to body weight ratio	0.313	0.301	[-4.8]	[-11.6]	[-6.4]	[-0.33]	[-9.9*]	[-7.0]
Relative to brain weight ratio	64.592	97.709	-1.9	[-17.9*]	[-4.6]	[-9.9]	[-3.4]	[-16.6*]
Kidney								
Absolute	2.80 g	-	-1.8	-	11.1	-	[28.6**]	-
Relative to body weight ratio	0.672	-	-4.0	-	8.9	-	[21.6**]	-
Relative to brain weight ratio	138.950	-	-1.5	-	11.7	-	[30.9**]	-

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT [redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Organ Weights (%) – PND 233 Recovery, Continued[f]								
Testes								
Absolute	NA	4.16 g	NA	-0.2	NA	[-17.1*]	NA	[-37.7**]
Relative to body weight ratio	NA	0.578	NA	9.3	NA	[-5.5]	NA	[-28.2**]
Relative to brain weight ratio	NA	188.005	NA	1.2	NA	[-15.6*]	NA	[-36.3**]
Histopathology (Incidence) – PND 98 Main								
Adrenal Cortex								
- necrosis								
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	0/10	[1/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[1/10]	0/10
severe	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]
- hypertrophy, zona fasciculata								
minimal	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[3/10]	[3/10]	[3/10]	[3/10]
mild	0/10	0/10	[2/10]	0/10	[5/10]	[5/10]	[2/10]	[2/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	[1/10]	[2/10]	[1/10]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT [redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 98 Main, Continued								
Epididymides								
- reduced sperm, luminal								
moderate	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/10
severe	NA	0/10	NA	[3/10]	NA	[8/10]	NA	[10/10]
- luminal debris, cellular								
minimal	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/10	NA	[1/10]
mild	NA	0/10	NA	[3/10]	NA	[9/10]	NA	[9/10]
Kidney								
- atrophy/hypoplasia, tubule, medullary/papillary								
minimal	0/10	0/10	[5/10]	[4/10]	[1/10]	0/10	[1/10]	[1/10]
mild	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	[4/10]	[3/10]	[2/10]	[3/10]
moderate	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	[2/10]	[4/10]	[6/10]	[6/10]
severe	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 98 Main, Continued								
Kidney, Continued								
- increased stroma, medullary/papillary								
minimal	0/10	0/10	[6/10]	[1/10]	[5/10]	[2/10]	[5/10]	[1/10]
mild	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[1/10]	0/10	[3/10]	[2/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]
- hemorrhage, medullary/papillary								
minimal	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[5/10]	0/10
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	0/10	0/10	0/10
- necrosis, papillary								
mild	0/10	-	0/10	-	0/10	-	[1/10]	-

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 98 Main, Continued								
Kidney, Continued								
- dilatation, tubule, medullary								
minimal	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[2/10]	[2/10]	[1/10]	[4/10]
mild	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[3/10]	[1/10]	[6/10]	[2/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	0/10	[3/10]	[3/10]
- dilatation, tubule, cortical								
minimal	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	0/10	[3/10]
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[2/10]
- dilatation, pelvis								
minimal	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[1/10]	[1/10]	0/10	[1/10]
mild	0/10	1/10	0/10	[2/10]	[1/10]	[6/10]	[4/10]	[5/10]

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 98 Main, Continued								
Kidney, Continued								
- glomerulonephritis, membranoproliferative								
minimal	0/10	0/10	[1/10]	[6/10]	[1/10]	[1/10]	0/10	0/10
mild	0/10	0/10	[5/10]	[1/10]	[5/10]	[7/10]	[2/10]	[2/10]
moderate	0/10	0/10	[2/10]	[1/10]	[3/10]	[1/10]	[7/10]	[8/10]
- nephropathy, chronic progressive								
minimal	1/10	5/10	[7/10]	[8/10]	[4/10]	[2/10]	[6/10]	0/10
mild	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[4/10]	[7/10]	[4/10]	[2/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[8/10]
Liver								
- vacuolation, hepatocellular, periportal								
minimal	1/10	2/10	[3/10]	2/10	[4/10]	[6/10]	[3/10]	[1/10]
mild	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[1/10]	[1/10]	[2/10]	[4/10]

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 98 Main, Continued								
Spleen								
- decreased cellularity, lymphoid, marginal zone								
minimal	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	[2/10]	[4/10]	[7/10]
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[4/10]	[3/10]	[3/10]
- increased cellularity, red pulp								
minimal	0/10	0/10	[6/10]	[3/10]	[6/10]	0/10	[6/10]	[4/10]
mild	0/10	0/10	[3/10]	[6/10]	[4/10]	[7/10]	[3/10]	[6/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[3/10]	0/10	0/10
Stomach, glandular								
- mineralization								
minimal	0/10	2/10	[7/10]	[8/10]	[8/10]	[9/10]	[5/10]	[10/10]
Testes								
- degeneration, tubular, bilateral								
moderate	NA	0/10	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	[6/10]
severe	NA	0/10	NA	[2/10]	NA	[7/10]	NA	[4/10]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 233 Recovery								
Adrenal Cortex								
- necrosis								
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	0/10	0/10
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]	0/10	0/10	0/10
- hypertrophy, zona fasciculata								
minimal	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	0/10
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]	0/10
- atrophy, zona fasciculata/zona reticularis								
minimal	0/10	0/10	[6/10]	[4/10]	[6/10]	[3/10]	[2/10]	[3/10]
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[3/10]	[3/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[4/10]

C Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT [redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 233 Recovery, Continued								
Epididymides								
- reduced sperm, luminal								
moderate	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	[1/10]	NA	0/10
severe	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	[7/10]	NA	[10/10]
- luminal debris, cellular								
minimal	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/10	NA	[1/10]
mild	NA	0/10	NA	[2/10]	NA	[8/10]	NA	[9/10]
Kidney								
- atrophy/hypoplasia, tubule, medullary/papillary								
minimal	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[2/10]	[1/10]	[1/10]	0/10
mild	0/10	0/10	0/10	[5/10]	[2/10]	[3/10]	[7/10]	[2/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[3/10]	[2/10]	[2/10]	[6/10]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT [redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 233 Recovery, Continued								
Kidney, Continued								
- increased stroma, medullary/papillary								
minimal	0/10	0/10	[4/10]	[4/10]	[1/10]	[2/10]	[1/10]	[2/10]
mild	0/10	0/10	[1/10]	[1/10]	[5/10]	[2/10]	[7/10]	[3/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[3/10]	[2/10]	[3/10]
- hemorrhage, medullary/papillary								
minimal	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[1/10	[3/10]
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	[3/10]	[1/10]	[4/10]	[3/10]
- dilatation, tubule, medullary								
minimal	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[2/10]	[1/10]	[1/10]
mild	0/10	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[1/10]	[6/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[7/10]	[2/10]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 233 Recovery, Continued								
Kidney, Continued								
- dilatation, tubule, cortical								
minimal	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[4/10]	[5/10]	[2/10]
mild	0/10	0/10	0/10	[2/10]	[2/10]	[4/10]	[3/10]	[4/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[1/10]
- glomerulonephritis, membranoproliferative								
minimal	0/10	0/10	[4/10]	[3/10]	0/10	[2/10]	0/10	[1/10]
mild	0/10	0/10	[4/10]	[4/10]	[6/10]	[6/10]	[3/10]	[4/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	[1/10]	[4/10]	[2/10]	[7/10]	[5/10]
- inflammation, chronic interstitial								
minimal	0/10	1/10	[6/10]	[5/10]	[3/10]	[3/10]	[3/10]	[1/10]
mild	0/10	1/10	[0/10]	[2/10]	[1/10]	[5/10]	[2/10]	[9/10]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験　　試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT [redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 233 Recovery, Continued								
Kidney, Continued								
- nephropathy, chronic progressive								
minimal	4/10	3/10	[6/10]	[7/10]	[5/10]	[2/10]	[8/10]	[3/10]
mild	1/10	2/10	0/10	[1/10]	[3/10]	[5/10]	[2/10]	[6/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[3/10]	0/10	[1/10]
Spleen								
- increased cellularity, red pulp								
minimal	0/10	0/10	0/10	[3/10]	[4/10]	[3/10]	[6/10]	[4/10]
mild	0/10	0/10	[1/10]	0/10	[3/10]	[1/10]	0/10	[1/10]
moderate	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	[1/10]	0/10	0/10
Stomach, glandular								
- mineralization								
minimal	0/10	0/10	1/10	[4/10]	[3/10]	[6/10]	[4/10]	[7/10]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Histopathology (Incidence) – PND 233 Recovery, Continued								
Testes								
- degeneration, tubular, bilateral								
mild	NA	0/10	NA	[1/10]	NA	0/10	NA	0/10
moderate	NA	0/10	NA	0/10	NA	[3/10]	NA	[4/10]
severe	NA	0/10	NA	[2/10]	NA	[5/10]	NA	[6/10]
TDAR Assessment (Mean Values) – Main								
Anti-KLH IgM (µg/mL)								
PND 48	-	-	-	-	-	-	-	-
PND 63	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-KLH IgG (µg/mL)								
PND 48	-	-	-	-	-	-	-	-
PND 63	-	-	-	-	-	-	-	-

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験 試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
TDAR Assessment (Mean Values) – Recovery								
Anti-KLH IgM (µg/mL)								
PND 224	-	-	-	-	-	-	-	-
PND 239	-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-KLH IgG (µg/mL)								
PND 224	-	-	-	-	-	-	-	-
PND 239	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunophenotyping – PND 85/88								
CD45+ Lymphocytes (x10^6/mL)	-	7.13	-	10.45	-	[13.04*]	-	[11.03*]
Natural Killer Cells (%)	3.98	-	[2.02*]	-	[1.82*]	-	[1.18*]	-
Natural Killer Cells (x10^6/mL)	0.29	-	0.21	-	0.18	-	[0.09*]	-
B Cells (%)	-	33.31	-	36.74	-	[41.74*]	-	[41.11*]
B Cells (x10^6/mL)	-	2.36	-	3.84	-	[5.60*]	-	[4.63*]

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

Weekly Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
Number of Animals – Total	F: 56	M: 56	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74	F: 74	M: 74
Number of Animals – Toxicokinetics[b]	F: 6	M: 6	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24	F: 24	M: 24
Number of Animals – Immunotoxicity[c]	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Number of Animals – PND 98 (Main)	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10
Number of Animals – GD 15/PND 233 (Recovery)	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20
Noteworthy Findings, Continued								
Immunophenotyping – PND 239/242								
CD45+ Lymphocytes (x10^6/mL)	-	6.97	-	8.32	-	6.97	-	[10.46*]
B Cells (%)	-	30.07	-	26.31	-	32.42	-	[35.85*]
B Cells (x10^6/mL)	-	2.10	-	2.21	-	2.30	-	[3.83*]
Bone Densitometry – PND 98 Main[f]								
Global Area (cm^2)	1.760	2.415	[8.1]	[1.4]	[5.4]	[1.5]	[6.4]	[-2.8]
BMC (g)	0.441	0.624	[9.3]	[1.9]	[3.4]	[1.3]	[3.9]	[-7.5]
BMD (g/cm^2)	0.251	0.258	[0.9]	[0.4]	[-2.0]	[-0.4]	[-2.7]	[-4.8]
Bone Densitometry – PND 233 Recovery[f]								
Global Area (cm^2)	2.042	2.925	[4.9]	[-1.9]	[2.2]	0.0	[6.0]	[-1.2]
BMC (g)	0.555	0.879	[5.4]	[-3.9]	[0.2]	[-6.4]	[8.5]	[-9.1]
BMD (g/cm^2)	0.272	0.300	[0.5]	[-2.0]	[-1.6]	[-6.5]	[1.9]	[-8.1]

(footnotes presented on following page)

Confidential

2.6.7.15 生殖発生毒性試験

試験番号：TT #[redacted]-7864 [4.2.3.5.4.2: TT[redacted]7864]（続き）

- =no noteworthy findings; ADA=anti-drug antibody(ies); ALP=alkaline phosphatase; $AUC_{0\text{-}168h}$=area under the concentration-time curve from time 0 to 168 hours; BLQ=below limit of quantification (0.04 µg/mL); BMC=bone mineral content; BMD=bone mineral density; BUN=blood urea nitrogen; C_{max}=observed maximum concentration; CREA=creatinine; CTD=common technical document; F=female; FOB=Functional Observational Battery; FSH=follicle stimulating hormone, GD=gestation day; GLP=Good Laboratory Practice; HCT=hematocrit; HDW=hemoglobin distribution width ; HGB=hemoglobin; IgG=Immunoglobulin G; IgM=Immunoglobulin M; KLH=keyhole limpet hemocyanin; M=male; MCH=mean corpuscular hemoglobin; MCHC=mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV=mean corpuscular volume; MPV=mean platelet volume; NA=not applicable; No.=number; PND=postnatal day; Q1W=once weekly; RBC=red blood cell count; RDW=red cell distribution width; TDAR=T-cell dependent antibody response; [ ]=test article-related change based on incidence and/or severity; #/# =number affected/number examined; * p≤0.05 (immunophenotyping) or p<0.05 (body weight, food consumption, vaginal patency/balanopreputial separation, FOB assessments, hematology, coagulation, serum chemistry, urinalysis, hormone analysis, and organ weight); **p<0.01.

a GLP with the exception that erythropoietin evaluations and PND 63 immunophenotyping analysis were performed non-GLP.

b 3 animals/sex/group/timepoint on PND 7 for toxicokinetic sampling and 3/animals/group on PND 128 for toxicokinetic sampling and ADA analysis.

c 10 animals/sex/group on PND 85/88 and 10 animals/sex/group on PND 239/242.

d One F in the 3 mg/kg group (Animal Number [redacted]) was found dead on PND 7 and no noteworthy clinical signs or macroscopic findings were noted, but due to the aggressive nature of the dam, the remaining animals in the litter (Control F Animal Number [redacted], Control M Animal Number [redacted], 1 mg/kg group F Animal Number [redacted], 1 mg/kg group M Animal Number [redacted], 3 mg/kg group M Animal Number [redacted], 10 mg/kg F Animal Number [redacted], and 10 mg/kg M Animal Number [redacted]) were euthanized on PND 7. One F in the Control group (Animal Number [redacted]) was found dead on PND 8 and the cause of moribundity could not be determined. One M in the Control group (Animal Number [redacted]) was euthanized in extremis on PND 9 and was noted with a clinical finding of a thin body on PND 9, had lower body weights compared to control group means, and cause of moribundity could not be determined. One M in the Control group (Animal Number [redacted]) was euthanized on PND 27 due to inadvertent mechanical trauma. One M in the Control group (Animal Number [redacted]) was found dead on PND 229 and cause of death was noted as bacterial sepsis. One M in the 3 mg/kg group (Animal Number [redacted]) was found dead on PND 31 and had clinical signs on the day of death as unkempt appearance, thin body, small feces, yellow material around the urogenital area, clear discharge from the left eye, and dermal atonia, and the cause of death was determined to be pyelonephritis. One M in the 3 mg/kg group (Animal Number [redacted]) was found dead on PND 147 and the cause of death was determined to be pulmonary inflammation and hepatic necrosis. One F in the 10 mg/kg group (Animal Number [redacted]) was found dead on GD 6 with clinical findings of persistent hindlimb findings (impaired use of, swollen, and reddened) noted throughout dosing and the recovery periods and the cause of death was determined to be bacterial sepsis. One M in the 10 mg/kg group (Animal Number [redacted]) was euthanized in extremis on PND 7, was noted as pale prior to euthanasia, and cause of moribundity could not be determined. One M in the 10 mg/kg group (Animal Number [redacted]) was euthanized in extremis on PND 9 and was noted with a clinical finding of a thin body on PND 9, had lower body weights compared to control group means, and cause of moribundity could not be determined. All unscheduled deaths were accidental or considered incidental in nature.

e One F in the 3 mg/kg group was euthanized in extremis on PND 70 and at necropsy fractured nasal bones were noted and were considered the cause of death. One F in the 10 mg/kg group was euthanized in extremis on PND 76 with clinical findings of red material around the nose and eyes, swollen facial area, and malaligned upper incisors on the day prior to and day of euthanasia and at necropsy fractured nasal and premaxilla bones were noted and were considered the cause of death.

f For controls, group means are shown. For test article-treated groups, percent differences from controls are shown.

g FOB, Motor Activity, and Biel Maze Swimming Trials assessments were recorded for all animals during the dosing period and the first 10 surviving animals/sex/group during the recovery period.

h Occurred in one M and correlated with kidney changes.

i Erythropoietin concentrations increased in a dose-related manner in males only at ≥3 mg/kg Q1W. The values remained within the normal range of variability and were considered to be of uncertain relationship to treatment.

C Confidential

2.6.7.16　局所刺激性試験

Sotatercept の局所刺激性を評価するための試験は実施していない。局所刺激性は、ラット及びサルを用いた反復静脈内及び皮下投与試験の一環として評価した。いずれの投与経路でも、ラット及びサルでの sotatercept の局所忍容性は良好であった。

Confidential

2.6.7.17 その他の毒性試験

Test Article: RAP-011

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Mice / CD-1	IP	3 months	0, 10, 30, 50 TW (RAP-011)	Main: 10/sex Recovery: 10/sex	Weekly administration of RAP-011 resulted in ↑ RBC parameters and ↑ splenic hematopoiesis. The lowest dose of 10 mg/kg, was sufficient to cause both ↑ RBC parameters and splenic hematopoiesis. At 30 and 50 mg/kg TW, significant mortality was seen which resulted in animals either sacrificed early or found dead. Significant ↓ in heart and kidney weight were seen even at the lowest dose of 10 mg/kg TW. The most significant histopathological findings (kidney tubular cell necrosis and myocardial degeneration) were most noticeable at the highest dose, 50 mg/kg TW, but a few microscopic observations (minimal mineralization of the choroids plexus, minimal multifocal alveolar histiocytosis, and myocardial degeneration) were also seen in animals dosed at 10 mg/kg TW.	TT #[redacted]-7811 [4.2.3.7.7.1: TT[redacted]7811]

Confidential

2.6.7.17 その他の毒性試験（続き）

Test Article: Sotatercept and RAP-011

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Study Number
Rat / Crl:CD(SD)	SC	13 weeks	0, 1, 10 Q1W (sotatercept); 10 Q1W (RAP-011)	3F/group – Sham surgical procedure (both models): 6F/group –5/6 nephrectomy; 6F/group – UUL	TT #[redacted]-7865 [4.2.3.7.7.2: TT[redacted]7865]

Noteworthy Findings:

- Slight ↑ RBC, HGB, and HCT with all doses of sotatercept or RAP-011, more robust ↑ in 5/6 nephrectomy than UUL groups which may be related to the proximity of the UUL procedure to the terminal blood collection for hematology assessment. No appreciable change in 1 mg/kg Q1W UUL group. Transient ↓ BW and ↓ FC in all groups following surgery or sham operation.
- One animal treated with 1 mg/kg Q1W had limited use of the forelimb. This animal also had ↓ RBC parameters and ↑ reticulocytes.
- **5/6 nephrectomy**: Persistent ↑ serum CREA, ↑ BUN, ↑ urine volume, ↓ urine CREA in all groups, with no additional sotatercept or RAP-011-related effect; ↑ urinary albumin and lipocalin-2 in all groups, with higher increases in sotatercept or RAP-011 treated groups; ↑ urinary TIM-1 and osteopontin with sotatercept or RAP-011 treatment.
- **UUL**: ↑ Urinary albumin with RAP-011 (also noted in sham operated rats). ↑ Urinary TIM-1, all groups with no additional sotatercept or RAP-011-related effects. ↑ lipocalin-2 in all groups, with higher increases in sotatercept or RAP-011 treated groups.
- **5/6 nephrectomy, vehicle treatment**: Minimal 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, αSMA), tubular (pSmad2) and tubulointerstitial (αSMA) immunostaining.
- **Sham operated groups (either 5/6 nephrectomy or UUL arm)**: Glomerular changes (including minimal ↑ in pSmad2 and αSMA immunostaining) similar to 5/6 nephrectomy vehicle treated group seen with sotatercept or RAP-011. Minimal tubulointerstitial changes with sotatercept treatment. Minimal to mild ↑ tubulointerstitial αSMA immunostaining with sotatercept (10 mg/kg Q1W) and RAP-011.
- **5/6 nephrectomy, sotatercept or RAP-011 treatment**: Compared with nephrectomized, vehicle treated or sham-operated, sotatercept/RAP-treated controls, similar but more severe spectrum of glomerular changes. 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 fibroplasia/fibrosis and/or mononuclear inflammatory cell infiltrates), and ↑ glomerular and tubulointerstitial immunostaining for pSmad2 and αSMA. Kidney injury was more pronounced in ADA-negative animals.
- **UUL**: Sotatercept and RAP-related glomerular changes in the kidneys of sham-operated animals, and contralateral kidneys of UUL-treated animals, were comparable to those in sotatercept and RAP-treated sham-operated animals in the 5/6 nephrectomy arm of the study. Histomorphologic changes in kidneys with ureteral obstruction were characteristic of obstructive nephropathy and there was no notable difference in the severity of obstructive nephropathy between vehicle and sotatercept/RAP treatment groups.
- **TK and ADA:** ↑ Drug concentrations were approximately dose proportional between 1 and 10 mg/kg Q1W sotatercept. ADA were detected in 58% and 11% of animals dosed with sotatercept and RAP-011, respectively. In ADA negative animals, post-last dose drug concentrations (4 hr post-last dose) were 2 to10-fold higher than post-first dose (4 hr postdose), indicating accumulation. Drug concentrations in post-last dose samples were reduced in most (but not all) ADA positive animals vs ADA negative animals, indicating loss of exposure due to immunogenicity.

↓=decrease; ↑=increase; αSMA=alpha smooth muscle actin; ADA=anti-drug antibody(ies); BW=body weight; BUN=blood urea nitrogen; CREA=creatinine; F=female; FC=food consumption; HCT=hematocrit; HGB=hemoglobin; IP=intraperitoneal(ly); No.=number; Q1W=once weekly; RBC=red blood cell count; SC=subcutaneous(ly); TIM-1=T cell Ig mucin; TK=toxicokinetic; TW=twice weekly; UUL=unilateral ureter ligation.

C Confidential