

Non-Clinical Trials Report

1. Name of medicinal product (if available - number of registration certificate):	Winrevair
1) type of medical product which proposed to registration	Medicinal product with complete dossier (stand-alone dossier). New active substance.
2) conducted researches	☒ Yes ☐ No If no, please justify
2. Pharmacology:	
1) primary pharmacodynamics	Primary Pharmacodynamics In Vitro Mechanism of Action Background Biology: Transforming Growth Factor Beta Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension The transforming growth factor-β (TGF-β) family of proteins is implicated in differentiation and proliferation of various cell types, cell metabolism, motility, invasion and death as well as extracellular matrix production. Thirty-three ligands have been identified so far, comprising TGF-β isoforms, activins, growth and differentiation factors (GDFs), inhibins, nodal, anti-Mullerian hormone (AMH), and bone morphogenetic proteins (BMPs). Each member of the TGF-β family of ligands require processing (cleavage) to become active. Once active, they bind, assemble, and stabilize specific combinations of heterotetrameric complexes of type I and type II serine/threonine and tyrosine kinase receptors. In general, binding of the ligands to their receptors induces type II receptor-mediated phosphorylation of the type I receptor causing activation of its kinase function. This phosphorylation induces intracellular signals categorized into canonical and non-canonical events. The canonical pathway engages mothers against decapentaplegic homologs (receptor-regulated, R-Smads) transcription factors, while the non-canonical one involves phosphorylation of multiple kinases such as the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated protein kinase 1 and 2 (Erk1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphoinositide-3-kinase (PI3K), Rho homologous (Rho) GTPase that promote transcription. At the endothelium, once type I receptors have been phosphorylated by their type II partners, they notably mediate the phosphorylation of Smad 2/3 (for type I (activin receptor-like

(ALK4/5)) engagement by activins, GDFs and TGF- β) and that of Smad 1/5/8 (for type I (ALK1/2/3) engagement by BMPs). These then assemble into a complex with a common Smad mediator (Co-Smad4) that facilitates internalization into the nucleus and binding to deoxyribonucleic acid (DNA). Endothelial cells simultaneously integrate both proliferative (TGF- β /activins-Smad2/3) and anti-proliferative (BMP-Smad1/5/8) signaling pathways that are also sensitive to the biomechanical forces exercised at the vasculature.

Members of the TGF- β superfamily of ligands that signal through Smad2/3 have been associated with hyperproliferation of vascular cells leading to arterial remodeling of pulmonary arteries and the cardiac chambers. As an example, TGF- β 1 has been shown to inhibit apoptosis of smooth muscle cells from pulmonary arteries through an activation of the PI3K/AKT pathway and to promote proliferation of pulmonary artery smooth muscle cell. A direct participation of TGF- β 1 to the narrowing of pulmonary arteries has been showed in the monocrotaline and Sugen-hypoxia models of pulmonary arterial hypertension (PAH) via the use of a TGF- β ligand trap (recombinant TGF β RII-Fc extracellular domain fusion protein selective for TGF- β 1 and TGF- β 3). In that model, TGF β RII-Fc blocked canonical Smad 2/3 signaling, inhibited vascular remodeling and ultimately, decreased right ventricle hypertrophy. Similar findings were reported with the use of a pan TGF- β antibody as well as a TGF- β receptor antibody. Dysregulated TGF- β signaling has also been reported in the cardiovascular manifestations of Marfan and Loeys-Dietz syndromes.

Activin A and GDF-11, two other members of the TGF- β family that trigger Smad2/3 signaling, have also been associated with hyperproliferation. Elevated expression of activin A and GDF11 in lung lesions, together with the increased circulating levels of activin A, has been shown in pulmonary hypertension (PH) patients and in preclinical models of PAH. At the lung, activin A seems to primarily localize at the bronchial epithelial cells and macrophages and has been reported to promote smooth muscle cell proliferation and expression of endothelin-1 (ET-1), a key modulator of PAH. While activin A stimulates proliferation of smooth muscle cell (SMCs), SMCs from PAH patients also display enhanced synthesis of activin A, providing a local feed-forward loop of proliferation. GDF-11's participation to PAH appears to be restricted to the endothelial cell compartment and its selective downregulation has been shown to be protective in a PAH model.

Genetic and function studies demonstrate that the attenuated BMP signaling is highly associated with the development of PAH. Dysregulation of bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2) signaling in pulmonary vascular endothelial cells, key regulators of pulmonary vascular structure and function, has been

shown to trigger the differentiation and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs), leading to the remodeling of the pulmonary vasculature, the identifying feature of PAH. The association between loss-of-function mutations in BMPR2 and development of PAH provides the most compelling evidence linking this signal pathway to the disease. In addition, the reduced protein levels of BMPR2 have been found in both familial and idiopathic PAH, even in the absence of BMPR2 mutation. The compelling evidence suggests that the imbalance between the activin/GDFs and BMP signaling pathway is a key contributing factor to PAH.

Sotatercept Mechanism of Action

Sotatercept is an activin signaling inhibitor. Its mechanism of action is through the restoration of balance between the opposing Smad2/3 and Smad1/5/8 intracellular signaling pathways. Sotatercept functions as a soluble form of activin receptor Type IIA (ActRIIA) to trap TGF- β superfamily ligands that normally bind to ActRIIA, such as activin A and B, GDF-11, GDF-8, and BMP-10, and prevent their binding to ActRIIA and induction of downstream Smad2/3 signaling. In the PAH disease state, the Smad1/5/8 pathway within pulmonary vascular endothelial cells is severely compromised, either by loss of function mutations in the BMPR2 receptor, or by factors (eg, triggered by activation of the ActRIIA/ALK(s) pathway) affecting Smad 1/5/8 signal transduction, leading to unchecked proliferation of vascular smooth muscle cells. Through inhibition of the Smad2/3 signal pathway, sotatercept rebalances the opposing Smad pathways, resulting in the restoration of homeostasis with respect to smooth muscle cell proliferation.

Amino Acid Sequence Identity Across Species

The extracellular domain (ECD) amino acid sequence and structure of ActRIIA is highly conserved across species including rat, rabbit, cynomolgus monkey, and human, and is identical between sotatercept and murine surrogate for sotatercept, constructed by exchanging the human IgG Fc of sotatercept with a murine IgG Fc (RAP-011). Amino acid sequence alignment shows 100 % homology between rodent, cynomolgus monkey, and human species for activin A and GDF-11, and 97 to 98 % homology for activin B and BMP10.

Primary Pharmacodynamics In Vivo

Murine Surrogate RAP-011

In vivo nonclinical pharmacology studies have been conducted with the sotatercept murine surrogate, RAP-011. The RAP-011 molecule was constructed by exchanging the human immunoglobulin G, subclass 1 (IgG1) fragment crystallizable region (Fc) of sotatercept with a murine immunoglobulin G, subclass 2a (IgG2a) Fc. The murine surrogate RAP-011 showed similar binding affinities (and selectivity profile) toward ligands of the TGF- β superfamily as sotatercept.

RAP-011 Activity in the Monocrotaline (MCT) and Sugen-Hypoxia Rat Pulmonary Arterial Hypertension Models

RAP-011 was tested in two well-known rodent models of PAH (monocrotaline and Sugenhypoxia). Both models replicate some of the key pathology associated with PAH, including endothelial and smooth muscle cells proliferation, muscularization of pulmonary arterial vasculature, development of pulmonary hypertension, and right ventricular hypertrophy.

In the monocrotaline (MCT) model, pulmonary hypertension was induced in male Wistar rats within 4 weeks after a single subcutaneous (SC) injection of monocrotaline at a dose of 40 mg/kg. Animals were treated with vehicle (10 mM tris-buffered saline (TBS), SC), RAP-011 (15 mg/kg, intraperitoneally (IP) twice weekly), or the vasodilator sildenafil (30 mg/kg, orally, twice daily) for 4 weeks starting 1 day after MCT. Vehicle-treated MCT rats showed significant elevation in mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and right ventricle (RV) hypertrophy. RAP-011 treatment for 4 consecutive weeks normalized mPAP and improved RV hypertrophy. Sildenafil had modest effects on mPAP and did not improve RV hypertrophy. RAP-011 treatment had a significant effect on pulmonary vascular remodeling.

In a similar study in the MCT-induced PAH model, vehicle-treated rats showed a significant increase in CD11b+ macrophages ($p<0.05$) in the lungs, whereas RAP-011 treatment significantly attenuated increase in CD11b+ macrophages ($p<0.05$). RAP-011 suppressed pulmonary inflammation and prevented macrophage infiltration in this PAH model.

In the Sugen-hypoxia model, pulmonary hypertension was established by a single SC injection of vascular endothelial growth factor receptor antagonist Sugen 5416 (SU5416, 200 mg/kg) in adult male Sprague Dawley rats with immediate onset of exposure to hypoxia (10 % oxygen) for 4 weeks. Animals were treated with vehicle (10 mM TBS, SC), RAP-011 (10 mg/kg, IP twice weekly), or sildenafil (30 mg/kg, orally, twice daily) for 4 weeks starting 1 day after vascular endothelial growth factor receptor antagonist Sugen 5416 (SU5416). Vehicle-treated Sugen-hypoxia rats showed a significant elevation in mPAP and RV hypertrophy. RAP-011 treatment for 4 consecutive weeks normalized mPAP and improved RV hypertrophy. Sildenafil had modest effects on mPAP and did not improve RV hypertrophy.

RAP-011 Activity in the Sugen-Hypoxia-Normoxia (SuHxNx) Rat Pulmonary Arterial Hypertension Model

RAP-011 was evaluated in the Sugen-hypoxia-normoxia (SuHxNx) rat model when the pulmonary hypertension and RV modeling were already established. In the SuHxNx model, pulmonary hypertension was established by a single SC injection of SU5416 (20 mg/kg) in adult male Sprague Dawley rats with immediate onset of exposure to hypoxia (10 % oxygen) for 3

weeks followed by normoxia (21 % oxygen) for another 6 weeks. SuHxNx rats exhibited pulmonary hypertension and RV hypertrophy at the onset of therapeutic treatment (Week 5) that continued undiminished through Week 9. Animals were treated with vehicle (phosphate-buffered saline (PBS); SC), RAP-011 (2.5 mg/kg, SC twice weekly), sildenafil (30 mg/kg, orally, twice daily), or a combination therapy between Weeks 5 and 9. Vehicle-treated SuHxNx rats showed a significant elevation in right ventricular systolic pressure (RVSP) and total pulmonary resistance index (TPRI). Treatment with RAP-011 starting at Week 5 reversed RVSP and markedly reduced TPRI by Week 9 compared with vehicle-treated SuHxNx rats. RAP-011 monotherapy and combination therapy with the vasodilator sildenafil produced significantly greater improvement than sildenafil alone.

In this model, pulmonary vascular remodeling was prominent in SuHxNx rats by Week 5 with lesions leading to varying degrees of vascular occlusion. At Week 9, there was a significantly greater prevalence of the most severe grade of vascular occlusion compared with the earlier time point, consistent with disease progression during this interval. Treatment with RAP-011 starting at Week 5 almost completely reversed vascular remodeling by Week 9 compared with untreated SuHxNx rats. Treatment with RAP-011 reversed vascular occlusion more effectively than sildenafil, and RAP-011 in combination with sildenafil produced significantly greater improvement in vascular occlusion than sildenafil alone.

RV remodeling and dysfunction were also observed in the model. Right ventricular wall thickness (RVWT) and RV hypertrophy were significantly increased in untreated SuHxNx rats at the onset of therapeutic treatment (Week 5) and continued through Week 9.

Treatment with RAP-011 starting at Week 5 markedly improved RVWT and RV hypertrophy by Week 9 compared with vehicle-treated SuHxNx rats. In comparison to the normal group, SuHxNx rats exhibited impaired RV function with a significant decrease in tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) and RV fractional area change at the onset of therapeutic treatment (Week 5) and continued through Week 9. Treatment with RAP-011 starting at Week 5 improved these parameters by Week 9 compared with vehicle-treated SuHxNx rats. RAP-011 monotherapy and combination therapy with the vasodilator sildenafil produced significantly greater improvement than sildenafil alone.

To assess whether the cardiopulmonary benefits of RAP-011 treatment in the SuHxNx PAH model is sustained after stopping treatment, RAP-011 treatment was withdrawn at Week 9 and animals monitored for 4 additional weeks. Treatment with RAP-011 starting at Week 5 produced significant improvement in RVSP, TPRI, TAPSE, pulmonary artery acceleration time

	(PAAT), and RV hypertrophy by Week 9 which were sustained through Week 13, 4 weeks after stopping RAP-011 administration, compared with untreated SuHxNx rats. RAP-011 Activity in the bone morphogenetic protein receptor 2 (<i>Bmpr2</i>^{+/^{R899X}) Mouse PAH Model} RAP-011 was also evaluated in a model of heritable PAH arising from <i>Bmpr2</i> haploinsufficiency (<i>Bmpr2</i>^{+/^{R899X} mice). In this model, pulmonary hypertension was induced by exposing <i>Bmpr2</i>^{+/^{R899X} male mice to hypoxic (10 % oxygen) conditions for 5 weeks.}} Simultaneously, mice were treated with vehicle (PBS, SC) or RAP-011 (10 mg/kg, SC twice weekly) for 5 weeks. Vehicle-treated mice showed significant elevation in RVSP and RV hypertrophy. RAP-011 treatment for 5 consecutive weeks normalized RVSP and RV hypertrophy. In comparison with <i>Bmpr2</i>^{+/^{R899X} mice under normoxic control conditions, exposure of <i>Bmpr2</i>^{+/^{R899X} mice to hypoxia significantly reduced TAPSE and PAAT, indicating RV dysfunction. RAP-011 significantly prevented the decrease in TAPSE and PAAT.}} RAP-011 Activity in the Pulmonary Artery Banding (PAB) Mouse Model of Right Heart Failure The cardioprotective effects of RAP-011 were evaluated in a mouse model of right heart failure caused by pressure overload. In this model, right ventricle pressure overload by pulmonary artery banding (PAB) induces RV remodeling and dysfunction. Animals were treated with vehicle (PBS, SC) or RAP-011 (10 mg/kg, SC. twice weekly) for 3 weeks starting 1 day post-surgery. In response to surgery, PAB PBS-treated mice showed a significant increase in RV developed pressure at Day 21 compared with the sham surgery group. RAP-011 treatment significantly reduced RV developed pressure compared with PBS-treated mice. PAB mice showed a significant decreased in TAPSE values compared with the sham surgery group. RAP-011 treatment significantly increased TAPSE by Day 21 compared with PBS-treated PAB mice. In this model, RV remodeling was also observed. RVWT and RV hypertrophy were significantly increased in PBS-treated PAB mice. Treatment with RAP-011 significantly improved these parameters compared with the PBS-treated PAB mice. PBS-treated PAB mice also showed a significant increase in collagen content in the right ventricle compared with the sham surgery group. Collagen content increase is associated with RV remodeling and dysfunction. RAP-011 treatment also significantly reduced RV collagen content in PAB mice compared with the PBS-treated group.
2) secondary pharmacodynamics	Nonclinical pharmacology studies using RAP-011 were undertaken to evaluate mechanism-related hematologic effects as it is known that activin, previously described as erythroid differentiation factor, plays a role in regulating the terminal differentiation of developing erythrocytes.

	Following administration of RAP-011 in C57BL/6 mice, the erythrocyte-stimulating-agent-like activity of RAP-011 resulted in significant increases in the numbers of red blood cell count (RBC), hemoglobin (HGB), and hematocrit (HCT). There was also a significant increase in erythropoietin protein. No other specific studies evaluating secondary pharmacodynamics of sotatercept were conducted because all of the key elements of pharmacodynamics described in International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) S6 for biotechnological products, including in vitro assays to assess biological activity and specificity, and in vivo studies to evaluate efficacy, were included in the primary pharmacodynamics section.
3) safety pharmacology	Consistent with ICH S6(R1), safety pharmacology endpoints (neurological examinations and body temperature, respiration rate, electrocardiogram (ECG), and blood pressure measurements) were incorporated into the Good Laboratory Practice (GLP) 9-month repeat dose toxicity study in monkeys. There were no sotatercept-related changes in any in vivo safety pharmacology endpoints. The in vitro hERG assay was the only standalone safety pharmacology study performed with sotatercept. The in vitro hERG assay estimated the IC₅₀ for inhibitory effects of sotatercept on human ether-à-go-go related gene (hERG) potassium channel to be greater than 1000 µg/mL. Sotatercept: Effect of Sotatercept on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells Sotatercept inhibited hERG current by (Mean ± SEM; n = 3) 7.2 ± 0.7% at 300 µg/mL, 28.6 ± 0.7% at 600 µg/mL and 33.8 ± 1.7% at 1000 µg/mL versus 2.4 ± 0.8% in control. hERG inhibition at all concentrations was statistically significant (p<0.05) when compared with vehicle control values. The IC₅₀ for the inhibitory effect of sotatercept on hERG potassium current was estimated to be greater than 1000 µg/mL. The highest test concentration of sotatercept at 1000 µg/mL represents approximately a 100-fold margin as compared with the clinical observed maximum concentration (C_{max} = 9.67 µg/mL) at the maximum recommended human dose (MRHD).
4) pharmacodynamic interactions	Nonclinical studies evaluating pharmacodynamic drug interactions with sotatercept have not been conducted. In agreement with a position paper from an international consortium regarding drug-drug interactions between therapeutic proteins and small molecule drugs, nonclinical in vitro and in vivo studies are not considered predictive of human pharmacodynamic drug interactions. The potential interaction with other drugs can only be addressed in clinical studies.
3. Pharmacokinetics:	

1) analytical procedures and validation reports	Concentrations of sotatercept in plasma or serum samples from Sprague-Dawley rats, New Zealand white (NZW) rabbits, and cynomolgus monkeys were determined by either a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or by a competitive ELISA during the development of the program. Methods were validated in rat serum initially with a quantitation range of 0.98 to 31.25 ng/ml and then subsequently with a higher quantitation range of 40.0 to 2,000 ng/mL. A method was validated in rabbit serum with a quantitation range of 40.0 to 2,000 ng/mL. Methods were validated in monkey plasma with a quantitation range of 86 to 2,333 ng/mL and then subsequently in monkey serum with a quantitation range of 7.81 to 250 ng/mL. Accuracy of sotatercept from the low range rat serum assay was 96.0 to 103.0% of the nominal values of the calibration curve and precision was 3.3 to 10.8% at all calibration concentrations. Inter-day accuracy and precision from the quality control (QC) samples ranged from 95.0 to 101.0% and 10.3 to 22.6%, respectively. Accuracy of sotatercept from the high-range rat serum method was 96.6 to 103.2% of the nominal values of the calibration curve and precision was 2.9 to 8.4% at all calibration concentrations. Inter-day accuracy and precision from the QC samples range from 84.4 to 91.6% and 6.7 to 19.3%, respectively. Accuracy of sotatercept from the rabbit serum assay was 98.4 to 103.5% of the nominal values of the calibration curve and precision was 1.3 to 5.6% at all calibration concentrations. Inter-day accuracy and precision from the QC samples ranged from 99.8 to 114.3% and 6.6 to 16.0%, respectively. Accuracy of sotatercept from the monkey plasma assay was 91.0 to 136.0% of the nominal values of the calibration curve and precision was 3.0 to 29.0% at all calibration concentrations. Inter-day accuracy and precision from the QC samples range from 83.0 to 91.8% and 6.0 to 15.0%, respectively. Accuracy of sotatercept from the monkey serum assay was 98.2 to 113.1% of the nominal values of the calibration curve and precision was 1.2 to 29.8% at all calibration concentrations. Inter-day accuracy and precision from the QC samples range from 86.1 to 92.8% and 8.1 to 15.6%, respectively. To detect the formation of anti-drug antibody (ADA) in Sprague-Dawley rats, NZW rabbits and cynomolgus monkeys, bridging immunoassays by ELISA or electrochemical luminescent (ECL) methods were validated for rat, rabbit, and monkey serum. An initial method was validated in rat serum with positive control (PC) values ranging from 25 to 1600 ng/mL. The inter assay precision of these PC samples ranged from 4.9 to 20.0%. The sensitivity of the assay was determined to detect 500 ng/mL of ADA. A method was validated in rat serum with positive control values ranging from 100 to 5000 ng/mL. The inter assay precision of these PC samples ranged from 5.0 to 6.6%. The sensitivity of the
--	--

	assay was determined to detect 9.3 ng/mL of anti-sotatercept antibody in rat serum. A subsequent partial validation was conducted in rat serum with positive control values ranging from 100 to 5000 ng/mL. The inter assay precision of these PC samples ranged from 8.9 to 11.9%. The sensitivity of the assay remained 9.3 ng/mL anti-sotatercept antibody in rat serum. A method was validated in rabbit serum with positive control values ranging from 100 to 5000 ng/mL. The inter-assay precision of these PC samples ranged from 6.0 to 7.9%. The sensitivity of the assay was determined to detect 24.5 ng/mL of ADA in rabbit serum. A method was validated in monkey serum with positive control values ranging from 25 to 1600 ng/mL. The inter-assay precision of these PC samples ranged from 5.7 to 24.3%. The sensitivity of the assay was determined to detect 500 ng/mL of ADA in monkey serum. A subsequent method was validated in monkey serum with positive control values ranging from 100 to 5,000 ng/mL. The inter assay precision of these PC samples ranged from 6.8 to 10.9%. The sensitivity of the assay was determined to detect 17.1 ng/mL of anti- sotatercept antibody in monkey serum. These method validations complied with the applicable guidance at the time. (Food and Drug Administration (FDA) Guidance for the Industry: Bioanalytical Method Validation (US FDA, 2001 and 2018) and US FDA Draft Guidance for Industry: Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins (US FDA, 2009 and 2019)).
2) absorption	Sotatercept PK parameters have been characterized in Sprague-Dawley rats, NZW pregnant rabbits, and cynomolgus monkeys following intravenous (IV) and/or SC injection. PK analysis was conducted using WinNonlin software (version 5.0.1 or higher) with first order absorption and first order elimination or noncompartmental analysis (NCA). Intravenous Route of Administration The PK of sotatercept were assessed following a single IV administration to rats and monkeys. In general, there were no substantial sex differences in sotatercept IV PK in the animal species examined. Single-Dose Intravenous Pharmacokinetic Studies in Rats Following single-dose IV administration to rats, sotatercept exhibited linear PK, with mean t_{1/2} ranging from 140.8 to 203.9 h (6 to 9 days) across the dose range of 1 mg/kg to 30 mg/kg. Mean clearance values were similar across doses, ranging from 0.12 to 0.14 mL/kg/h. Single-Dose Intravenous Pharmacokinetic Studies in Monkeys Following single-dose IV administrations to monkeys, sotatercept exhibited linear PKs with mean t_{1/2} of sotatercept

ranging from 217 to 253 h (9 to 11 days) within the dose range of 1 mg/kg to 30 mg/kg.

Subcutaneous Route of Administration

PK of sotatercept was assessed following SC administration to rats and monkeys. In general, there were no substantial differences in sotatercept SC PK with respect to sex in the animal species examined after single and multiple dose administration.

Single-Dose Subcutaneous Pharmacokinetic Studies in Rats

A single SC dose administration of 3, 10, or 30 mg/kg of sotatercept to rats resulted in a roughly dose proportional increase in area under the concentration-time curve (AUC) and C_{max} .

Single-Dose Subcutaneous Pharmacokinetic Studies in Monkeys

A single SC dose administration of 1, 10, or 30 mg/kg of sotatercept to monkeys resulted in a less than dose proportional increase in AUC and C_{max} values.

Repeat-Dose Pharmacokinetic Studies

Sotatercept exposures after SC administration of multiple doses were assessed in GLP studies in rats, pregnant rabbits, and cynomolgus monkeys. Repeat-dose administration was performed once weekly in rat and rabbit and once every two weeks in monkey based on the half-life of sotatercept observed in rats (4 to 8 days), rabbits (2 to 3 days), and monkeys (7 to 9 days).

Repeat-Dose Pharmacokinetic Studies in Rats

Repeat-dose PK of sotatercept was evaluated following weekly SC administrations to rats at dose levels of 0.3, 3, and 30 mg/kg as part of a 3-month GLP toxicity study. On Day 1, sotatercept systemic exposure increased in an approximately dose-proportional manner and in a less than dose-proportional manner on Day 92. No notable sex differences in exposure were apparent except at 3 mg/kg on Day 92 where the exposure in males was 2.4 times higher than the exposure in females, possibly due to the presence of ADA in some Day 92 samples. Sotatercept accumulation in serum was observed only at the 0.3 mg/kg dose with an accumulation ratio (R_c) of 2.6. The accumulation at the higher dose levels may have been impacted by the presence of ADA. Although some ADA positive animals appeared to maintain drug levels, ADA generally resulted in diminished exposure, a shorter half-life, and minimal accumulation ratios. The overall ADA positive rate in all sotatercept-dosed animals during the dosing phase was 43.6 %.

Repeat-Dose Pharmacokinetic Studies in Rabbits

Repeat-dose PK of sotatercept was evaluated following weekly SC administration to pregnant rabbits at 0.5, 1.5, and 5 mg/kg. After the first and last dose (gestation day (GD) 7 and GD 14), C_{max} and AUC_{0-168h} increased approximately dose proportionally within the dose range. The apparent $t_{1/2}$ ranged from 97.6 to

	205.5 h (4.1 to 8.6 days) after the first dose and was shorter after the second dose with values ranging from 47.6 to 85.2 h (2.0 to 3.6 days). There was no to minimal accumulation with Rc ranging from 0.9 to 1.6. ADA were detected in 40.6% of sotatercept-dosed animals. For the TK subset of animals, antibodies had an impact on sotatercept exposure in 3 of 9 animals. Repeat-Dose Pharmacokinetic Studies in Monkeys Repeat-dose PK of sotatercept was evaluated following every two-week SC administration to monkeys as part of the 27-week GLP toxicity study. Sotatercept was administered at doses of 10, 30, and 50 mg/kg. There were no observed sex-related differences in exposures. C_{max} values increased approximately proportionally with doses up to 30 mg/kg after the first and last dose (Study Day 183), while at 50 mg/kg, C_{max} increased greater than dose proportional after the first dose and less than dose proportional after the last dose. AUC_{0-336h} increased approximately dose proportional after the first and last dose. There was sustained exposures over the study with minimal accumulation from the first to the last dose (mean Rc was 1.46). Antibodies to sotatercept were detected in 16.7% to 33.3% of dosed animals with one ADA-positive animal exhibiting decreased exposures on Day 183. A similar PK interpretation is also obtained from a 9-month repeat-dose toxicity study following every two-week SC administration of sotatercept to monkeys.
3) distribution	Sotatercept is a fusion protein therapeutic with a calculated molecular weight (based on amino acid sequence) of the sotatercept homodimer of 78 kilodalton (kDa) and consists entirely of naturally occurring amino acids. Its distribution to tissues is expected to be limited and similar to a monoclonal antibody. Hence, typical distribution studies of sotatercept in nonclinical species have not been conducted. Repeat-dose PK of sotatercept was evaluated following weekly SC administration to pregnant rabbits at 5, 15, and 50 mg/kg. Sotatercept was detected in pooled fetal serum samples at each dose level on GD 29 indicating that by the end of gestation the fusion protein can cross the placental barrier. The fetal serum concentrations ranged from 1 % to 39 % of maternal concentrations. In a pre- and postnatal developmental toxicity study in rats, sotatercept was administered to lactating rats. Sotatercept-related effects on the suckling offspring were observed, suggesting that sotatercept is distributed into rat milk.
4) metabolism	Sotatercept is a protein therapeutic consisting entirely of naturally occurring amino acids and typical proteolytic pathways are expected to be the primary route of catabolism. No traditional metabolism studies were conducted with sotatercept per current ICH S6 (R1) guidance on preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals.

5) elimination	Sotatercept is a protein therapeutic consisting entirely of naturally occurring amino acids and its excretion is expected to be similar to monoclonal antibodies. Studies of the excretion of sotatercept in nonclinical species and human have not been conducted.
6) pharmacokinetic interactions (non-clinical)	As a protein therapeutic, sotatercept is expected to be catabolized into amino acids by general protein degradation processes and not eliminated by renal or hepatic pathways, hence sotatercept is not expected to be affected by potential drug-drug interactions that occur for small molecules through interactions with metabolic enzymes and transporters. Also, sotatercept impact on drug metabolizing enzymes and transporters are expected to be low as no modulation of cytokine levels are anticipated based on its mechanism of action. Hence, studies describing the potential of sotatercept to inhibit or induce drug metabolizing enzymes and transporters have not been conducted nor are they needed.
7) other pharmacokinetic studies	No other PK studies have been conducted.
4. Toxicology:	
1) single-dose toxicity	Sotatercept: Sprague Dawley Rats, Given a Single Intravenous Injection (10 and 30 mg/kg) of Sotatercept Plus Controls Subsequent to the 4-week IV toxicity study in rats where the adrenal gland was identified as a target organ, a non-GLP, exploratory study was conducted to evaluate the time course of sotatercept-related toxicity in the adrenal gland following a single IV injection to female Sprague Dawley rats. Twelve control and 14 treated female Sprague Dawley rats/group were administered single IV doses of 10 or 30 mg/kg sotatercept. Parameters evaluated were limited to anatomic pathology examinations. On Study Days 8 and 28, half of the animals from each group (6/control and 7/treated/groups) were euthanized, the adrenal gland, liver, kidneys, and pancreas were collected, and the adrenal glands were subsequently examined histomorphologically. There were no test article-related gross or organ weight changes. On Study Day 8, there were no test article-related histomorphologic changes in the adrenal glands. However, by Study Day 28, moderate cortical necrosis with associated mineralization was observed in the adrenals of 1 of 7 animals that received 10 mg/kg and 3 of 7 animals that received 30 mg/kg. Adrenal gland findings comprised approximately 30 to 70% of adrenocortical cross-sectional area and were bilateral in all instances. The findings were centered within the zona fasciculata or zona reticularis with complete sparing of the zona glomerulosa. The adrenal medulla, which was variably present in the sections examined, was unaffected. Under the conditions of this study a NOEL was not established.

2) repeated dose toxicity	Subcutaneous Dosing in Rats Sotatercept: A 3-Month Subcutaneous Toxicity Study in Rats with a 1-Month Recovery The purpose of this GLP study was to evaluate the toxicity of sotatercept when administered once weekly (Q1W) for 3 months to male and female Sprague Dawley rats by the SC route. Additionally, the study was designed to investigate the reversibility of any treatment-related toxicity during a 1-month treatment-free period. Sprague Dawley rats (15/sex/group) were administered 0.3, 3, or 30 mg/kg of sotatercept SC Q1W for 3 months (a total of 13 doses). Five rats/sex/group were retained for a 1-month treatment-free period. Rats were approximately 6 to 8 weeks of age at the time of first dose. Assessment of toxicity was based on mortality, clinical observations, body weights, food consumption, steroid hormone determinations (females only), and clinical and anatomic pathology evaluations. Serum concentrations of sotatercept (treated animals) and immunogenicity (ADAs) (control and treated animals) were determined. There were no test article-related unscheduled deaths, clinical signs, or changes in body weight, urinalysis parameters or follicle stimulating hormone levels. During the dosing period, test article-related increases in food consumption occurred in females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W in the absence of body weight effects, and therefore were of nominal toxicological significance. At the end of the dosing period (Study Day 90), test article-related, pharmacologically-mediated, hematology changes generally included mild increases in indicators of circulating erythrocyte mass (RBC, red cell distribution width (RDW), and/or HGB) and decreases in mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) at ≥ 0.3 mg/kg Q1W, increases in reticulocytes at ≥ 3 mg/kg Q1W, and/or increases in platelet volume at 30 mg/kg Q1W that were all non-adverse. Clinical chemistry findings were limited to a minimal increase in blood urea nitrogen (that remained within the range of historical control values) at 30 mg/kg Q1W. In animals necropsied on Study Day 90, postmortem changes occurring at ≤ 3 mg/kg Q1W were considered non-adverse based on low incidence and the character and extent of the changes. The sotatercept formulation was well tolerated at the SC injection sites. Decreases in heart weight at ≥ 0.3 mg/kg Q1W in males and females and increased liver weight at 30 mg/kg Q1W in females occurred in the absence of a histological correlate and were not considered adverse at any dose level. Test article-related effects in the testes included minimal to moderate hypo-spermatogenesis at 0.3 mg/kg (1 animal) and 30 mg/kg Q1W, and aspermatogenesis with minimal mononuclear cell infiltrates and spermatid giant cells at 3 mg/kg Q1W (1 animal) that correlated
---------------------------	---

with epididymal mass and reduced size of testis/seminal vesicle at 3 mg/kg Q1W and mild, multifocal unilateral atrophy of the testis at 30 mg/kg Q1W. In the adrenal cortex, mild, focal or diffuse congestion occurred at ≥ 0.3 mg/kg Q1W and multifocal mineralization of the adrenal cortex and increased adrenal weights occurred at 30 mg/kg Q1W. Kidney findings included minimal membranous or membranoproliferative glomerulonephritis and minimal to mild tubular cell basophilia at ≥ 0.3 mg/kg Q1W, and mild/minimal focal tubular degeneration/atrophy with tubular dilatation, interstitial fibrosis, and/or mononuclear inflammatory cell infiltration at 30 mg/kg Q1W that correlated with fluid accumulation adjacent to the kidneys noted grossly and decreases in kidney weight at 30 mg/kg Q1W. Although these kidney changes were initially attributed to immune complex deposition secondary to ADA formation, additional investigation suggests that sotatercept-mediated kidney toxicity is a direct effect.

During the treatment-free period and at the recovery necropsy (Study Day 120), test article-related findings were limited to moderate, unilateral, diffuse, or locally extensive aspermatogenesis in the testis of 2 of 5 males at 30 mg/kg Q1W that were consistent with testes changes observed during the treatment period. Heart weight, adrenal and kidney changes demonstrated recovery at all dosages following the treatment-free period.

Serum sotatercept concentration data were determined prior to dosing (at trough) on Study Days 7 (after the first dose), 14, 28, 56, 84, 90 (after the last dose), and 120 (at the end of the treatment-free period). TK data did not include area under the curve or C_{max} due to limited sampling.

Serum concentrations measured during the dosing period showed considerable variation among individual animals at each dose level. These variations were considered consistent with development of ADAs in a subset of animals. The overall rate of positivity for ADA responses based on ELISA values above the positive control threshold was 51 of 88 (58 %) of treated animals evaluated. The rate of positivity for ADA responses based on the specificity assay was 7 of 83 (8.4%). Comparison of individual animal pharmacokinetic and ADA data from the treatment-free period animals showed a high degree of correlation between animals that failed to maintain sotatercept concentration levels above the limit of quantitation during the dosing period and animals that had ELISA positive ADA values, regardless of the outcome in the specificity component to the immunogenicity (ADA) assay.

In conclusion, adverse test article-related findings were limited to 30 mg/kg Q1W animals and consisted of tubulointerstitial and glomerular changes in the kidneys, mineralization of the adrenal cortex, and atrophy or hypo-spermatogenesis in the testis. Heart

weight, adrenal and kidney changes demonstrated recovery at all dosages following the treatment-free period.

In contrast, testicular findings at 30 mg/kg Q1W were not reversible. Glomerular nephritis was originally considered a consequence of immune complex deposition related to immunogenicity (ADA), however, in a subsequent rat study it was determined that this was likely a direct toxic effect of sotatercept. Under the conditions of this study and based on the non-adverse nature and complete reversibility of effects at ≤ 3 mg/kg, the no observed adverse effect level (NOAEL) was 3 mg/kg Q1W, corresponding to an estimated area under the concentration-time curve from zero to 168 hours (AUC_{0-168h}) of 2090 $\mu g \cdot h/mL$ (2-fold the clinical exposure at the maximum human recommended dose [MRHD]).

Sotatercept: A 3-Month Toxicokinetic Study of Sotatercept by Subcutaneous Injection in Rats with a 1-Month Recovery Period

The objectives of this GLP study were to determine the TK and immunogenicity (ADA) of sotatercept, and the potential utility of urinary biomarkers of renal toxicity in monitoring kidney changes, when sotatercept was administered SC to Sprague Dawley rats Q1W for 3 months followed by a 1-month treatment-free period.

Sprague Dawley rats (16/sex/group) were administered 0.3, 3, or 30 mg/kg of sotatercept or vehicle only SC Q1W for 3 months (a total of 14 doses). Six rats/sex/group were assigned for TK/immunogenicity (ADA) sample collection and retained for a 1-month treatment-free period.

Assessment of toxicity was based on mortality, clinical observations, body weights, clinical pathology (hematology, clinical chemistry, urine biomarkers), and gross and anatomic pathology evaluations of the kidney. Serum concentrations of sotatercept (control and treated animals) and ADA (treated animals) were determined.

There were no test article-related unscheduled deaths. One male at 30 mg/kg Q1W was found dead on Study Day 57. This death was of uncertain relationship to treatment as Study Day 29 hematology and chemistry (creatinine and blood urea nitrogen (BUN)) changes were similar to values in other 30 mg/kg Q1W animals and the cause of death was not apparent based on the gross or microscopic examination of the kidneys.

During the dosing period, test article-related clinical observation findings were limited to distended abdomen that occurred in two 30 mg/kg Q1W animals. Small increases in mean body weights were noted for females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W during the dosing period and persisted at 30 mg/kg Q1W throughout the treatment-free period.

Beginning on approximately Study Day 29 and usually continuing to Study Day 93, test article-related,

pharmacologically-mediated, hematology changes generally included mild increases in indicators of circulating erythrocyte mass (RBC, HCT, and HGB content), increases in RDW and reticulocytes, and decreases in MCH, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and/or MCV at ≥ 0.3 mg/kg Q1W, and decreases in platelets at 30 mg/kg Q1W that were all of minimal toxicological significance. The majority of these findings persisted in males at ≥ 0.3 mg/kg Q1W and 30 mg/kg Q1W females through the treatment-free period. There were no test article-related clinical chemistry changes.

Dose and time-dependent increases in the urinary kidney injury biomarkers osteopontin, lipocalin-2, and albumin were observed in sotatercept-treated rats. Moderate increases (approximately 5-fold over control) in osteopontin and lipocalin-2 were observed during the dosing period (Study Day 93), primarily at 30 mg/kg Q1W. Albumin increases (up to approximately 50-fold over control) were most apparent at 30 mg/kg Q1W during the treatment-free period (Study Day 121).

At the end of the dosing period (Study Day 93), left kidney enlargement (attributed to fluid accumulation within the renal capsule) observed in two 30 mg/kg Q1W animals correlated with minimal to mild cystic dilation and fibrosis of the renal capsule. Minimal to moderate membranoproliferative glomerulonephritis was noted in males at ≥ 3 mg/kg Q1W and females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W. Minimal to mild chronic progressive nephropathy was noted in females at ≥ 3 mg/kg Q1W, and minimal to mild interstitial mineralization was noted in males and females at 30 mg/kg Q1W. At the end of the treatment-free period (Study Day 121), gross and microscopic kidney changes from the dosing period had not resolved, and minimal to moderate chronic progressive nephropathy was now present in both males and females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W.

However, there were no notable renal biomarker changes at ≤ 3 mg/kg Q1W and based on the low severity and incidence of the histological findings, kidney changes at ≤ 3 mg/kg Q1W were not considered adverse.

In general, sotatercept concentrations were lower in animals that were ADA positive. In the TK animals, sotatercept serum concentrations were below limit of quantification (BLQ) at 3 mg/kg in 2/4 ADA positive animals on Study Day 92 and in 3/5 ADA positive animals on Study Day 121. At 30 mg/kg, only 1 animal tested positive for ADA and its serum concentrations were BLQ beginning on Study Day 92.

Sotatercept serum concentrations in the main study animals at termination on Study Day 93 were similar to those in the TK animals at 24 h postdose on Study Day 92. However, in the 0.3 and 3 mg/kg dose group there were 4/5 and 7/13 ADA positive animals, respectively, that had sotatercept concentrations that were BLQ. At 30 mg/kg in the main study animals, sotatercept concentrations were significantly reduced in ADA positive

animals. On Study Days 92/93, the overall incidence of ADA at 0.3, 3, and 30 mg/kg Q1W was 19 %, 65 %, and 28 %, respectively.

Following multiple dosing, serum sotatercept concentrations appeared to increase in some dose groups. The Study Day 92 to Day 1 AUC_{0-168h} ratios at 0.3, 3, and 30 mg/kg Q1W were 3.1, 1.4, and 1.7 in males, respectively, and 2.3, 0.55, 0.92 in females, respectively. The presence of ADA in Study Day 92 samples likely contributed to lower accumulation ratios in the 3 and 30 mg/kg Q1W groups.

An attempt to correlate the presence of ADA with glomerular changes in all sotatercept-treated groups was unsuccessful and demonstrated the opposite that, in general, urine albumin increases and glomerulonephritis occurred in animals that were ADA negative.

Instead, the glomerular changes correlated to increased sotatercept serum levels on Day 93, indicating that the glomerular changes are likely a direct effect of sotatercept and not related to immune complex deposition.

In conclusion, administration of sotatercept Q1W for 3 consecutive months at 0.3, 3, and 30 mg/kg resulted in body weight, clinical pathology, and nonreversible kidney changes at serum concentrations (Study Day 92) similar to those observed in an earlier 3-month SC toxicity study in rats performed at the same doses. In both 3-month rat studies, the NOAEL was 3 mg/kg Q1W (AUC_{0-168h} 2090 µg*h/mL, 2-fold the clinical exposure at the MRHD). In the current study, increases in the urinary kidney injury biomarkers osteopontin, lipocalin-2, and albumin generally correlated with adverse kidney toxicity occurring at 30 mg/kg Q1W, and kidney findings at dosages ≤ 3 mg/kg Q1W were not adverse based on the low incidence and severity of the histological findings. Additionally, glomerular toxicity was shown to be greatest in ADA negative animals, suggesting that sotatercept may have direct toxic effects on the kidney.

Intravenous Dosing in Rats

Sotatercept: A Study To Determine The Potential Toxicity of Sotatercept When Administered to Male and Female Sprague-Dawley Rats via Intravenous Injection Once a Week for 4 Weeks Followed by a 4-Week Recovery

The objective of this GLP study was to determine the potential toxicity of sotatercept when administered to male and female Sprague-Dawley rats via IV injection once a week for 4 weeks. Sprague Dawley rats (15/sex/group) were administered 1, 10, or 30 mg/kg of sotatercept IV Q1W for 4 weeks (a total of 4 doses). Five rats/sex/group were retained for a 4-week treatment-free period.

Assessment of toxicity was based on mortality, clinical observations, body weights, food consumption, and clinical and

anatomic pathology (including bone marrow smear and male reproductive capacity assessments) examinations. Plasma concentrations of sotatercept and ADAs were determined in treated samples.

There were 2 unscheduled deaths that were of uncertain relationship to treatment. One 10 mg/kg Q1W male was found dead on Study Day 19 after observation of blood in the urine on Study Day 18. One 30 mg/kg Q1W male was euthanized in moribund condition on Study Day 23. Hematology changes and many postmortem changes in the moribund 30 mg/kg Q1W male were consistent with findings observed in 30 mg/kg Q1W animals at scheduled necropsy on Study Day 29. The cause of death or moribund condition for the unscheduled death animals was not determined.

There were no test article-related clinical observations or changes in body weight, food consumption, or urinalysis parameters.

On Study Day 29, test article-related, pharmacologically-mediated, hematology changes generally included mild increases in indicators of circulating erythrocyte mass (RBC, HCT, and HGB content) at ≥ 1 mg/kg Q1W. These changes correlated with slight increases in total erythroid cell count in males at ≥ 10 mg/kg Q1W and in females at ≥ 1 mg/kg Q1W, compared to controls, as assessed via qualitative and quantitative microscopic evaluation of bone marrow smears. Additional hematology changes included mild increases in reticulocytes at ≥ 1 mg/kg Q1W, mild increases in basophils (at 10 mg/kg Q1W only) and large unstained cell count (at ≥ 10 mg/kg Q1W) in males, and mild decreases in MCH at ≥ 1 mg/kg Q1W, MCHC at ≥ 10 mg/kg Q1W, and platelets in males at ≥ 10 mg/kg Q1W, that were all of minimal toxicological significance. The mild increases in RBC, HGB, and HCT and decreases in MCH persisted at ≥ 10 mg/kg Q1W through the 1-month treatment-free period. At the end of the treatment-free period there were no microscopic findings in the bone marrow that corresponded to these alterations. All hematology and bone marrow findings were non-adverse.

There were very slight to slight increases in mean alanine aminotransferase (ALT) (2 to 3-fold over control), aspartate transferase (AST) (1 to 2-fold over control), and alkaline phosphatase (ALP) (1-fold over control) at 10 mg/kg Q1W and 30 mg/kg Q1W in females on Study Day 29. The 1 mg/kg Q1W female mean AST was also significantly higher than control (1-fold over control). In males, changes in liver enzymes (ALT increased very slightly at 10 mg/kg Q1W only) were less remarkable than those in females on Study Day 29.

After the 1-month treatment-free period (Study Day 57), mean aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase values were increased 2-fold over control at 30 mg/kg Q1W in females. On Study Day 57 in males, ALP values were increased 2-fold over control at 10 mg/kg Q1W only. Due to their small magnitude and

the absence of microscopic findings in the liver that corresponded to these alterations, the increases in liver enzymes were non-adverse. Notable increases in liver enzymes did not occur at similar serum/plasma concentrations in the subsequent SC 3-month rat toxicity studies.

Test article-related anatomic pathology changes were observed in the testes/epididymides at ≥ 10 mg/kg Q1W, and pancreas and adrenal gland at ≥ 1 mg/kg Q1W. Additionally, there were increases in ovarian weight at ≥ 10 mg/kg Q1W, and decreases in heart weight at ≥ 1 mg/kg Q1W, kidney weight at ≥ 10 mg/kg Q1W, and uterine weight at 30 mg/kg Q1W that all occurred in the absence of correlating microscopic changes and were non-adverse. In the testes at ≥ 10 mg/kg Q1W, sperm granulomas noted microscopically correlated with nodules/foci in the epididymides observed grossly. Additionally, testicular degeneration (dilation of tubules, decreased number of spermatids in the seminiferous tubules, spermatid giant cells) often correlated with the presence of sperm granulomas and an increase in mean testicular weight. In the adrenal gland in females at ≥ 1 mg/kg Q1W, necrosis in the cortex and medulla correlated with increases in adrenal weights and enlargement/discoloration and foci noted grossly. In the pancreas, apoptosis of acinar cells, zymogen granule depletion and atrophy of pancreatic acini occurred at ≥ 1 mg/kg Q1W and were generally minimal to mild in severity. Due to the low severity of the pancreas changes across the dose range, the presence of acinar cell apoptosis in control and treated rats, and because similar effects in the pancreas were not observed in subsequent SC rat studies at doses up to 30 mg/kg Q1W or in monkeys at any dose level, the pancreas changes were not related to treatment with sotatercept. The sotatercept formulation was well tolerated at the injection sites.

At the end of the 1-month treatment-free period (Study Day 57), pancreatic changes at ≥ 1 mg/kg Q1W that were not considered test article-related and decreases in heart weight, sperm granuloma in the epididymides/testicular degeneration, and adrenal gland necrosis/chronic necrosis at ≥ 10 mg/kg Q1W had not resolved.

In the male reproductive assessment, changes in sperm parameters generally correlated with test article-related histologic findings in the testes. Decreases in sperm motility and epididymal sperm count, and increases in sperm fragmentation, occurred at 30 mg/kg Q1W at the end of the dosing period. At the end of the treatment-free period, increased sperm fragmentation and decreased sperm motility occurred in 2 of 5 animals at 10 mg/kg Q1W only.

Sotatercept plasma concentrations were determined on Study Days 2 and 3 after the first dose, prior to dosing on Study Day 7, and prior to each necropsy.

At 1, 10, and 30 mg/kg Q1W, anti-drug antibodies (ADAs) were detected on Study Day 29 in 7/10, 1/10, and 2/10 animals and on Study Day 57 in 4/10, 0/10, and 2/10 animals, respectively. Higher titer antibodies detected on Study Day 29 that then persisted through to Study Day 57 tended to be associated with lower plasma concentrations of sotatercept. At 1 mg/kg Q1W, sotatercept plasma concentrations were below the limit of quantitation in 2/10 animals on Study Day 29 and 7/10 animals on Study Day 57.

In conclusion, IV administration of sotatercept at 1, 10, and 30 mg/kg Q1W for 4 weeks resulted in adverse changes at all dose levels. Adrenal gland necrosis was observed in females at ≥ 1 mg/kg Q1W, and 2 unscheduled deaths of uncertain relationship to treatment as well as histomorphologic changes in the testes/epididymides occurred at ≥ 10 mg/kg Q1W.

Neither the adrenal nor testicular changes demonstrated reversibility at doses ≥ 10 mg/kg Q1W following a 4-week treatment-free period. Based on these findings, the NOAEL following IV administration was < 1 mg/kg Q1W.

Subcutaneous Dosing in Monkeys

Sotatercept: A 3-Month Subcutaneous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 2-Month Recovery

The purpose of this GLP study was to evaluate the potential toxicity and TK of sotatercept when administered SC every 2 weeks for 3 months to male and female cynomolgus monkeys. Additionally, the study was designed to investigate the reversibility of any treatment-related toxicity during a 2-month treatment-free period.

Cynomolgus monkeys (4 to 6/sex/group) were administered 10, 30, or 50 mg/kg sotatercept SC Q2W for 3 months (a total of 7 doses). Two/animals/sex in the control and high-dose groups were retained for a 2-month treatment-free period.

Assessment of toxicity was based on mortality, clinical observations, body weights, food consumption, electrocardiogram and ophthalmology examinations, and clinical and anatomic pathology evaluations. Plasma concentrations of sotatercept (control and treated samples) and ADAs (treated samples) were determined.

All animals survived until scheduled termination. There were no test article-related clinical observations or body weight, food consumption, ophthalmic, ECG, coagulation, or urinalysis changes.

Test article-related, pharmacologically-mediated, hematology changes included mild increases in indicators of circulating erythrocyte mass (that generally included HGB, HCT, RBC, and RDW) and reticulocytes and decreases in MCH and MCHC that generally occurred at all dose levels and were of minimal toxicological significance. These changes resolved during the treatment-free period.

Test article-related clinical chemistry changes at ≥ 10 mg/kg once every two weeks (Q2W) were limited to minimally increased mean creatinine and blood urea nitrogen (BUN) values. At the end of the treatment-free period (Study Day 148), mean creatinine values were increased at 50 mg/kg Q2W in females only. In all instances, creatinine and BUN values in treated animals remained within the laboratory historical control data range. Thus, these changes were considered non-adverse and of minimal toxicological significance.

There were no test article-related gross or organ weight changes. At the terminal necropsy (Study Day 92), test article-related histomorphologic changes occurred in the kidney at ≥ 30 mg/kg Q2W and consisted of mild to moderate multifocal or diffuse membranoproliferative hypercellularity of the glomeruli that resulted in secondary tubular changes (corticomedullary fibrosis, mononuclear infiltrate, tubular basophilia and tubular ectasia) at 50 mg/kg Q2W. At 30 mg/kg Q2W in the terminal sacrifice group, these glomerular changes were mild and noted in 4/8 monkeys. At 50 mg/kg Q2W, these changes were mild to moderate in all monkeys at the terminal sacrifice and mild in all monkeys at the end of the treatment-free period. The severity and distribution of the lesion was less in the treatment-free period animals, suggesting that with time, resolution of the glomerular lesion would occur. These findings were originally considered to be related to ADA formation and antigen/antibody complex deposition in the glomeruli. However, subsequent studies indicated the kidney changes were likely a direct effect of sotatercept and not due solely to immune deposition.

Predose trough plasma levels obtained at 2, 4, 8, and 12 weeks remained stable throughout the dosing period. A comparison of trough concentrations obtained from single timepoints collected prior to the second dose (Study Day 14) and prior to the last dose (Study Day 84) indicated that group mean plasma concentrations were similar on both days and that adequate exposure was maintained in the animals throughout the dosing period.

ADAs were detected in only 1 animal on Study Day 15 and did not impact exposure in this animal.

In conclusion, minimal non-adverse clinical pathology changes were observed at all doses and membranoproliferative, hypercellularity of the glomeruli occurred in the kidneys at ≥ 30 mg/kg Q2W (mild at 30 mg/kg Q2W and mild to moderate at 50 mg/kg Q2W) with secondary renal tubular effects at 50 mg/kg Q2W. Compared to the terminal necropsy findings, the severity and distribution of the glomerular change was less in the 50 mg/kg Q2W treatment-free period animals, suggesting that with time, resolution of the glomerular lesion would occur. Because of the mild degree of glomerular change at 30 mg/kg Q2W, the indication of at least partial reversal at 50 mg/kg Q2W, and lack of biologically significant alterations in correlating clinical chemistry parameters, the NOAEL for this study was

30 mg/kg Q2W, corresponding to a Study Day 1 C_{max} and AUC_{0-312h} of 351 µg/mL and 82,389 µg*h/mL (32-fold the clinical exposure at the MRHD), respectively.

Sotatercept: A 27-Week Subcutaneous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 13-Week Recovery

The purpose of this GLP study was to determine the potential toxicity and TK of sotatercept when administered SC once every 2 weeks for 27 weeks to male and female cynomolgus monkeys. Additionally, this study was designed to investigate the reversibility of any treatment-related toxicity during a 13-week treatment-free period.

Cynomolgus monkeys (6/sex/group) were administered 10, 30, or 50 mg/kg of sotatercept SC Q2W for 27 weeks (a total of 14 doses). Three monkeys/sex/group were retained for a 13-week treatment-free period.

Assessment of toxicity was based on mortality, clinical observations, body weights, food consumption, electrocardiogram and ophthalmology examinations, and clinical and anatomic pathology evaluations. Serum concentrations of sotatercept and ADAs were determined in control and treated samples.

This study was initially designed as a 9-month study with a 2-month treatment-free period. Doses were selected based on data from the 3-month toxicity study.

However, following the unscheduled deaths of two 30 mg/kg Q2W-dosed females with clinical and anatomic pathology findings suggestive of immune complex-mediated glomerular nephritis and renal toxicity, the study was amended to terminate dosing at 27 weeks to reduce the potential impact of putative immunogenicity (ADA) reactions on animal welfare and data interpretation.

There were 2 test article-related unscheduled deaths. Two 30 mg/kg Q2W females were euthanized in moribund condition on Study Days 142 and 156. Prior to termination, test article-related changes in these animals included hunched and thin appearance, cold to touch, low activity, rough hair coat, severe appetite loss and dehydration, and moderate to marked increases in BUN and creatinine values (compared to historical controls). Postmortem findings included moderate to severe tubulointerstitial nephritis and glomerulonephritis that correlated with tan appearance of the kidneys noted grossly and increases in BUN and creatinine. Additional postmortem changes included moderate lymphoid depletion in the thymus in both animals. Minimal focal acute myocardial necrosis with mononuclear cell infiltrates, multifocal chronic inflammation in the pancreas with focal arteritis, and red adrenals noted grossly occurred in 1 early death animal.

In surviving animals, there were no sotatercept-related clinical signs or effects on body weight, food consumption, ECG, ophthalmic, coagulation, or urinalysis parameters.

	Test article-related, pharmacologically-mediated, hematology changes included mild increases in indicators of circulating erythrocyte mass (HGB, HCT, and RBC) and reticulocytes that occurred at all dose levels, resolved during the treatment-free period, and were non-adverse. Total white blood cell and lymphocyte counts in control and treated animals were comparable. Test article-related clinical chemistry changes in surviving animals were limited to mild increases in BUN and creatinine in females at 50 mg/kg Q2W that were noted beginning on Study Day 152 and continued to Study Day 190 (end of dosing period). During the treatment-free period, mean BUN and creatinine values decreased but remained above baseline, and creatinine remained increased in 1 female with glomerulonephritis and tubulointerstitial nephritis. At the terminal necropsy on Study Day 190, test article-related histomorphologic changes were observed at all doses in the kidneys and thymus, and in the choroid plexus of the brain at ≥ 30 mg/kg Q2W. Tubulointerstitial nephritis in the kidney was present at all dose levels, affected females more than males, and increased in incidence and severity (minimal to marked) in a dose-related manner. The finding of tubulointerstitial nephritis correlated with gross findings of pale/tan/mottled kidney discoloration of the kidneys present at all doses and with increased mean kidney weights at 50 mg/kg Q2W only. Tubulointerstitial nephritis was characterized by multifocal to coalescing tubular atrophy with variable degrees (often prominent) of interstitial fibrosis. Masson's Trichrome stains performed in representative tissue from animals with tubulointerstitial nephritis showed prominent deposition of loose connective tissue (collagen) in the interstitium, primarily distributed along cortical tubules and around glomeruli and adjacent tubules (compared to control). Associated glomeruli were sometimes atrophic and sclerotic. Minimal to moderate glomerular membranoproliferative hypercellularity (glomerulonephritis) was observed predominately at ≥ 30 mg/kg Q2W and was present at higher incidence in females. There was generally a direct correlation between the severity of tubulointerstitial nephritis with glomerular membranoproliferative hypercellularity and the magnitude of BUN and creatinine increases in 50 mg/kg Q2W females on Study Day 183. At the end of the treatment-free period (Study Day 274), minimal to marked tubulointerstitial nephritis and/or minimal glomerular membranoproliferative hypercellularity remained present in the kidney at ≥ 10 mg/kg Q2W at an incidence comparable to that observed at the end of the dosing period. The severity of the glomerular membranoproliferative hypercellularity had lessened compared to the terminal necropsy, suggesting possible partial recovery.
--	--

At the end of the dosing period, decreases in mean thymus weight at 50 mg/kg Q2W correlated with minimal to moderate lymphoid depletion were observed at ≥ 10 mg/kg Q2W.

The incidence and severity of lymphoid depletion was not dose-related but was most pronounced in the unscheduled death animals. At the end of the treatment-free period this lymphoid finding was no longer present in any dose group.

In the choroid plexus at terminal necropsy, minimal to slight foamy macrophage infiltrates were observed in 1 to 2 animals/group at ≥ 30 mg/kg Q2W. During the treatment-free period, this change remained present at a comparable incidence and severity.

AUC_{0-336h} and C_{max} increased in a dose-proportional manner over the dose range tested.

Sotatercept accumulated in the circulation following repeated SC dosing every 2 weeks. In Week 27, mean accumulation ratios were 1.82 and 1.46 for C_{max} and AUC_{0-336h}, respectively. ADAs were consistently detected in 8/48 animals; 2/12 animals at 10 mg/kg Q2W, 2/12 animals at 30 mg/kg Q2W, and 4/12 animals at 50 mg/kg Q2W. In one 50 mg/kg Q2W-dosed male, ADAs increased sotatercept clearance, resulting in pre-dose drug levels below the limit of quantitation beginning on Study Day 57 through Study Day 183 (the end of the dosing period).

In conclusion, sotatercept administration to cynomolgus monkeys for 27 weeks resulted in tubulointerstitial nephritis and/or glomerulonephritis at all doses that generally increased in incidence and severity in a dose-related manner and correlated with increases in BUN and creatinine in 50 mg/kg Q2W final necropsy females and two 30 mg/kg Q2W females that were terminated in Study Weeks 21/23 in moribund condition resulting from moderate to marked renal toxicity. Following the 13-week treatment-free period, renal histomorphologic changes showed little evidence of recovery. In contrast, BUN and creatinine values decreased during the treatment-free period, which was consistent with partial functional recovery of the kidneys. In the choroid plexus, foamy macrophage infiltrates noted at ≥ 30 mg/kg Q2W were of similar incidence and severity in final and treatment-free period necropsy animals.

Lymphoid depletion noted at final necropsy at ≥ 10 mg/kg Q2W did not correlate with changes in circulating total white blood cell or lymphocyte counts and was not present at any dose level in treatment-free period necropsy animals. Based on renal findings present in treatment-free period necropsy animals at all doses, the NOAEL for this study was < 10 mg/kg Q2W.

Sotatercept: A 9-Month Subcutaneous Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys with a 2-Month Recovery

The objective of this study was to determine the potential toxicity of sotatercept when administered Q2W for 9 months to cynomolgus monkeys at doses of 0, 10, 30, and 50 mg/kg.

In Study Week 9 (after a total of 4 SC doses), data collection was suspended and the study was terminated to eliminate any interpretative complications due to an unusually high incidence of *Plasmodium spp.* organisms identified in peripheral blood smears of control and treated animals. One animal that received 50 mg/kg Q2W sotatercept was euthanatized moribund in Study Week 5 with fulminant malaria. Subclinical *Plasmodium spp.* infection was present in several animals prior to study start (as determined via blood smears), which may have resulted from sourcing the animals from a region where *Plasmodium spp.* infection was endemic in nonhuman primates.

It is unlikely that the increased incidence and severity of plasmodium infection in this study was test article-related. No evidence of an immunosuppressive basis for increased susceptibility to infection has been observed in any test species treated with sotatercept.

There have been no adverse effects on peripheral blood leukocyte numbers or bone marrow histomorphology in any test species treated with sotatercept, and when juvenile rats were challenged with keyhole limpet hemocyanin (KLH) to assess T-cell dependent antibody response (TDAR), rats treated with sotatercept were able to mount an immunoglobulin G (IgG) response comparable to controls.

In mouse models of early plasmodium infection, erythropoietin-induced reticulocytosis and increased red blood cell counts accelerated parasite replication and increased mortality. In contrast, IFN- α -mediated reductions in blood parasite load were associated with reductions in erythropoiesis and reticulocytosis. Based on these data, it is plausible that the modest effects of sotatercept on red cell maturation (small reversible increases in HCT, RBC, HGB, and reticulocyte count) increased the susceptibility of plasmodium-infected monkeys to the development of overt malaria.

Sotatercept: A 9-Month Toxicity Study of Sotatercept Administered Subcutaneously in Cynomolgus Monkeys, with a 3-Month Recovery Period

The objectives of this GLP study were to assess the potential toxicity of sotatercept when administered subcutaneously to cynomolgus monkeys for 9 months (every 4 weeks for a total of 10 doses or every 2 weeks for a total of 20 doses), and to evaluate recovery from the effects of sotatercept over a treatment-free period of at least 3 months. The dose levels were selected based on the 27-week toxicity study in monkeys.

Cynomolgus monkeys (4/sex/group) were administered vehicle (PBS) or sotatercept at doses of 1, 2.6, and 10 mg/kg once every four weeks (Q4W) (a total of 10 doses) or 10 mg/kg Q2W (a total of 20 doses) SC at a dose volume of 0.2 mL/kg. An additional 2/monkeys/sex were assigned to the vehicle, 2.6 and 10 mg/kg

Q4W, and 10 mg/kg Q2W dose groups and retained for a 3-month treatment-free period.

Assessment of toxicity was based on mortality, safety pharmacology core battery evaluations (neurological examination, body temperature, respiration rate, and blood pressure measurements), clinical observations, body weights, food consumption, electrocardiogram and ophthalmology examinations, and clinical and anatomic pathology (included bone marrow smear) evaluations. Transmission electron microscopy (TEM) was used to further characterize changes in the choroid plexus and kidney. Kidney, choroid plexus, liver and lung formalin-fixed paraffin-embedded tissues were examined via immunohistochemistry (IHC) (non-GLP) to evaluate the biodistribution of sotatercept and the potential involvement of immune complex deposition in glomerular and vascular changes. Serum concentrations of sotatercept and ADAs were determined in control and treated samples.

There were no test article-related unscheduled deaths. Unscheduled deaths occurred in two animals (one 2.6 mg/kg Q4W female and one 10 mg/kg Q4W male) that were euthanized on Study Day 153 in moribund condition resulting from enterocolitis. Because enterocolitis was not uncommon in the testing facility and did not develop in additional animals in a dose-responsive manner, these deaths were considered unrelated to treatment.

There were no sotatercept-related clinical signs or effects on neurological, body temperature, respiration rate, blood pressure, food consumption, ECG, coagulation, or ophthalmic parameters. Test article-related body weight gain was decreased in males and females administered 10 mg/kg Q2W, resulting in final body weights during Week 40 that were 18 % and 8 % lower than controls, respectively. At the end of the treatment-free period, body weights in treated groups were comparable to or exceeded controls.

Test article-related, pharmacologically-mediated, hematology changes included mild changes in indicators of circulating erythrocyte mass (increases in HGB, HCT, RBC, RDW and decreases in MCV, MCH) and mild increases in reticulocytes that were generally similar across dose groups and did not progress in severity with increased dosing duration. Increases in circulating erythrocyte mass correlated with minimally lower bone marrow myeloid: erythroid ratios at 10 mg/kg Q2W. Platelet counts were minimally decreased in males only at 10 mg/kg Q2W. Lastly, there were slight, sporadic, non-dose responsive minimal to mild increases in monocyte counts in some animals at all dose levels. All hematology changes were non-adverse and demonstrated reversibility by the end of the treatment-free period.

Test article-related clinical chemistry changes in males and females included minimal to mild increases in BUN and

creatinine at ≥ 2.6 mg/kg Q4W. These changes became evident on Study Day 85 and generally progressed in a dose-related manner through Study Day 280, correlated with histopathologic renal changes, and were considered adverse at ≥ 2.6 mg/kg Q4W. All clinical chemistry changes resolved by the end of the 12-week treatment-free period.

Test article-related urinalysis changes in males and females included minimal increases in urinary protein at ≥ 2.6 mg/kg Q4W and in urine occult blood at ≥ 10 mg/kg Q4W, that generally began on Study Day 280 and resolved by the end of the treatment-free period.

Test article-related postmortem changes were observed primarily in the kidneys, choroid plexus, spleen, and liver of terminal necropsy animals. The sotatercept formulation was well tolerated at the SC injection sites. Minimal to mild membranoproliferative glomerulopathy, minimal to mild interstitial inflammation with fibrosis, minimal increased matrix deposition at the corticomedullary junction, and/or increased incidence of small glomerular tufts occurred in males and females at ≥ 10 mg/kg Q4W (the incidence and severity of membranoproliferative glomerulopathy was greater at 10 mg/kg Q2W compared to 10 mg/kg Q4W) and correlated with increased kidney weight in 10 mg/kg Q2W males and with gross kidney changes (enlargement, discoloration, and/or irregular cortical surfaces) at ≥ 10 mg/kg Q4W. Kidney changes at 2.6 mg/kg Q4W were limited to minimal interstitial inflammation with fibrosis in 1 male and increased incidence of small glomerular tufts in males and females. At 1 mg/kg Q4W, kidney changes were limited to minimal increased matrix deposition at the corticomedullary junction that was present in 2 females and were non-adverse. Further examination of the kidney from a subset of 10 mg/kg Q2W animals via IHC demonstrated that glomerular and tubular morphologic changes were co-localized with deposition of IgG, immunoglobulin M (IgM), and/or complement (C3), which are changes compatible with an immune reaction to sotatercept. Classical immune complex deposition was not evident in kidney sections examined using TEM. However, excess protein deposition was observed in and around mesangial cells, which may correlate with the cynomolgus IgM and IgG deposition demonstrated by immunohistochemistry. Accumulation of sotatercept (human IgG Fc portion and/or ActRIIA portions) could not be demonstrated using multiple antigen retrieval and amplification methods, preventing a conclusion on the localization of sotatercept with host antibodies in the kidney.

In the choroid plexus, test article-related changes included mononuclear cell (lymphocytes and plasma cells) and foamy macrophage infiltrates. Small focal aggregates of mononuclear inflammatory cells were seen at minimal to mild severity in the choroid plexus of most animals at ≥ 1 mg/kg Q4W. Because mononuclear cell infiltrates of this severity are occasionally

observed as a background change and were not associated with other sotatercept-related changes, they were considered non-adverse. Minimal to mild perivascular accumulations of foamy macrophages were seen at a low incidence (1 to 2 animals/group) at 2.6 and 10 mg/kg Q4W. At 10 mg/kg Q2W, the incidence (6/8) and severity (minimal to moderate) of this change was higher. Accumulations of foamy macrophages were associated with minimal intimal thickening of small arteries and arterioles predominately at 10 mg/kg Q2W. IHC evaluation of choroid plexus from a subset of 10 mg/kg Q2W animals confirmed that foamy macrophages and vascular alterations were associated with the deposition of monkey IgG, IgM, and/or C3, compatible with an immune reaction to sotatercept. Similar to the kidney, TEM demonstrated excess proteinaceous material in a perivascular pattern, which may represent the host antibody deposition seen by IHC. Accumulation of sotatercept could not be demonstrated using multiple antigen retrieval and amplification methods, preventing a conclusion on the localization of sotatercept with host antibodies in the choroid plexus. In the absence of associated clinical changes, and because changes in the choroid plexus were reversible at all dosages, these changes were not considered adverse. Liver and lung tissues from a subset of 10 mg/kg Q2W animals were also examined by IHC and did not detect the presence of immune complexes.

Test article-related decreases in splenic weights at ≥ 10 mg/kg Q4W correlated with mild to moderate reductions in the size and number of follicular germinal centers (lymphoid depletion) in the spleen at ≥ 2.6 mg/kg Q4W. There were no test article-related effects in other lymphoid tissues.

A test article-related increase in the incidence of minimal mononuclear cell infiltrate in liver was noted in all treated groups. At 1 mg/kg Q4W, the incidence of this change was similar to that occasionally seen in the livers of untreated monkeys at the testing facility and was not considered adverse.

Minimal to mild perivascular or vascular basophilic deposits occurred sporadically in the heart, aorta, and/or pancreas in 1 to 2 animals at each sotatercept dose level. This finding was not considered adverse due to its low severity and the lack of correlative adverse changes in these tissues.

At the end of the 3-month treatment-free period, all test article-related changes at ≤ 10 mg/kg Q4W had resolved. At 10 mg/kg Q2W, test article-related findings at the end of the recovery period were limited to minimal interstitial inflammation with fibrosis in the kidney that correlated with irregular cortical capsular surfaces and red discoloration of the renal cortex noted grossly in a single male. Slightly increased incidences of small glomerular tufts were observed at 2.6 mg/kg and 10 mg/kg Q2W. The absence of membranoproliferative glomerulopathy at ≥ 10 mg/kg Q4W suggested that partial recovery had occurred.

Because small glomerular tufts occur in some monkeys as a background finding, this change was not considered adverse. AUC and C_{max} increased in a dose-proportional manner following single and repeat doses.

Following repeat dosing, sotatercept accumulated in serum. In Week 37, mean accumulation ratios for Q4W dosing were 1.55 and 1.19 for C_{max} and AUC_{0-672h}, respectively. For Q2W dosing, Week 39 accumulation ratios for C_{max} and AUC_{0-336h} were 1.66 and 1.60, respectively.

One 10 mg/kg Q4W female was ADA positive, but ADA did not impact sotatercept clearance in this animal. No ADA positive animals were identified when the same samples were reanalyzed using a more sensitive immunogenicity (ADA) assay.

In conclusion, sotatercept administration to cynomolgus monkeys for 9 months resulted in test article-related findings at all doses. At ≥ 2.6 mg/kg Q4W during the dosing period, adverse test article-related findings included clinical chemistry changes indicative of renal injury, interstitial inflammation with fibrosis and increased incidence of small glomerular tufts in kidney, and lymphoid depletion in the spleen. At dosages ≥ 10 mg/kg Q4W, adverse histomorphologic changes in the kidney included membranoproliferative glomerulopathy, interstitial inflammation with fibrosis, increased matrix deposition at the corticomedullary junction, and/or increased incidence of small glomerular tufts. At the end of the 3-month treatment-free period, adverse findings were present in one 10 mg/kg Q2W male with interstitial inflammation and fibrosis in the kidneys. The absence of membranoproliferative glomerulopathy at ≥ 10 mg/kg Q4W suggested that partial recovery had occurred in the kidneys. Slightly increased incidences of small glomerular tufts at 2.6 mg/kg Q4W and 10 mg/kg Q2W were not considered adverse because small glomerular tufts may be present in control monkeys as a background finding. All other test article-related findings had resolved by the end of the 3-month treatment-free period.

Because all findings at 1 mg/kg Q4W were of minimal/mild severity, present at low incidence, and/or reversible, the NOAEL for this study was 1 mg/kg Q4W (AUC_{0-672h} 6030 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, 1-fold the clinical exposure at the MRHD).

Intravenous Dosing in Monkeys

Sotatercept: A Study to Determine the Possible Toxicity and Toxicokinetics of 4 Weekly Intravenous Doses of Sotatercept Administered to Male and Female Cynomolgus Monkeys

The objective of this GLP study was to determine the potential toxicity and TK of sotatercept when administered to male and female cynomolgus monkeys via four Q1W IV injections.

Cynomolgus monkeys (5/sex/group) were administered 1, 10, and 30 mg/kg sotatercept IV Q1W for 4 weeks (a total of 4

doses). Two monkeys/sex/group were retained for a 4-week treatment-free period.

Assessment of toxicity was based on mortality, clinical observations (including assessment of respiratory rate, heart rate, rectal body temperature, and capillary refill time), body weights, food consumption, electrocardiogram and ophthalmology examinations, and clinical and anatomic (including assessment of bone marrow smear and male reproductive capacity) pathology evaluations. Plasma concentrations of sotatercept and ADAs were determined in treated samples.

There were no unscheduled deaths or test article-related clinical observations, and no changes in body weight, food consumption, ophthalmic, ECG (qualitative evaluation of morphology), coagulation, urinalysis, or postmortem (gross, organ weight, histology) parameters. The sotatercept formulation was well tolerated at the injection sites.

Test article-related, pharmacologically-mediated, hematology changes included mild increases in indicators of circulating erythrocyte mass (HGB, HCT, and RBC) and reticulocytes that occurred at all dose levels during the dosing and treatment-free periods.

Increases in circulating erythrocyte mass correlated with mildly lower bone marrow myeloid: erythroid ratios at ≥ 10 mg/kg Q1W on Study Day 57.

Increases in mean alkaline phosphatase observed in males at all doses on Study Days 15, 29, and, to a lesser extent, on Study Day 57 had no corresponding microscopic findings, were not present in other sotatercept monkey studies, and were not considered test article-related.

Due to the young age (3 to 4 years old) and sexual immaturity of the animals, epididymal sperm counts ranged from low to none, resulting in highly variable data in all dose groups.

The evaluation of the potential adverse effects of sotatercept on epididymal sperm count and sperm morphology, therefore, was not possible.

At 1, 10, and 30 mg/kg Q1W, ADAs were detected on Study Day 29 in 0/10, 1/10, and 1/10 animals and on Study Day 57 in 0/4, 2/4, and 1/4 animals, respectively. High sotatercept concentrations can interfere with the detection of ADAs in serum, therefore the true incidence of anti-sotatercept antibodies is uncertain. The plasma concentrations of sotatercept did not appear to be affected by the presence of ADAs.

In conclusion, IV injection of sotatercept at up to 30 mg/kg Q1W for 4 weeks was generally well tolerated by cynomolgus monkeys. Test article-related changes were limited to non-adverse pharmacologically-mediated effects on erythroid parameters at ≥ 1 mg/kg Q1W that correlated with decreased myeloid/erythroid ratios at ≥ 10 mg/kg Q1W. Based on these findings, the NOAEL following intravenous administration was ≥ 30 mg/kg Q1W.

3) genotoxicity: <i>in vitro</i>	Genotoxicity studies with sotatercept have not been conducted as these studies are not required for biotechnology-derived products, according to ICH S6(R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals.
<i>in vivo</i> (including an additional assessment of toxicokinetic)	
4) carcinogenicity:	
long-term stability studies	Carcinogenicity studies were not performed with sotatercept due to the potential for ADA to negatively impact exposure following long-term administration to rodents and concerns related to renal toxicity leading to decreased animal survival. In a short duration rat study, sotatercept mean exposures were maintained throughout the study. However, ADA incidence reached up to 65 % by the end of the 3-month dosing period, and many individual animals had sotatercept concentrations that were below the limit of quantitation. In the male fertility study, which has a dosing duration similar to the 3-month TK study, ADAs were detected at a total incidence rate of 57.3 %. Following longer duration dosing, ADA rates in rodents would be expected to further increase and adversely impact sotatercept exposure and the interpretation of data from long term rodent studies. Also, in the 3-month rat study, sotatercept-mediated renal toxicity (membranoproliferative glomerulonephritis), an effect that has not translated to the clinic to date, occurred in rats at dosages ≥ 0.3 mg/kg Q1W and was associated with increases in urinary kidney injury biomarkers at 30 mg/kg Q1W. Progression of this toxicity, especially in conjunction with the development of chronic progressive nephropathy common in aging rats, would be anticipated to reduce animal survival and the feasibility of long-term rat studies. Therefore, in accordance with ICH S6(R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, the carcinogenic potential of sotatercept was evaluated in a weight of evidence-based risk assessment (Request for Waiver of Carcinogenicity Studies). The weight of evidence (WOE) risk assessment and a request to waive the requirement for carcinogenicity studies was previously submitted to the US Food and Drug Administration Executive Carcinogenicity Assessment Committee. The committee confirmed that carcinogenicity studies are not required for sotatercept. Similarly, EMA informally agreed that carcinogenicity studies are not required. Key considerations presented in the WOE risk assessment are summarized below. Sotatercept is a biologic agent and an inhibitor of growth-promoting cytokines that are members of the TGF-β superfamily. The principal sotatercept ligands are activin A, activin B, GDF-11, GDF-8, and BMP-10. These ligands signal via an overlapping set of receptors and are coupled to the same set of Smad proteins. Despite this overlap, the functional redundancy between members of the transforming growth factor (TGF) superfamily is
short-term or medium-term studies	
additional studies	

limited by different spatiotemporal expression patterns of ligands and receptors, differences in signaling dynamics, and regulatory proteins that modulate responses at different steps.

In animal models of pulmonary hypertension, sotatercept had anti-proliferative effects on vascular smooth muscle cells. In normal, healthy animals, sotatercept treatment did not result in proliferative or pre-neoplastic changes in any species examined as part of the comprehensive nonclinical toxicology program. As a biologic therapeutic, sotatercept does not pose a risk for genotoxicity.

Activins may modulate hormonal signaling, mainly via the stimulation of follicle stimulating hormone (FSH) release from the pituitary. Increased FSH signaling and/or plasma concentrations are associated with an increased incidence of breast and ovarian epithelial cancers. Therefore, sotatercept-related decreases in FSH could be beneficial in the context of these tumor types. GDF-11, GDF-8, and BMP-10 involvement in hormone modulation has not been described. In sotatercept-treated male and female rats, changes observed in reproductive tissue structure and/or function are likely due to activin inhibition and not hormone modulation. In male rats, changes in the testes and epididymis, and effects on male fertility, were considered secondary to outflow obstruction at the level of the efferent ducts and were not consistent with potential direct effects on sex hormones. In female rats, increases in pre- and post-implantation loss may be attributed to mechanism-based decreases in activins, which are critical in endometrial decidualization and priming of the endometrium for implantation. In the sotatercept juvenile rat studies, very small changes in luteinizing hormone (LH), FSH, and/or estradiol were not considered toxicologically significant, and increases in erythropoietin concentrations in individual animals were small and of uncertain relationship to treatment. Although the monkeys in the nonclinical studies were not sexually mature, sotatercept administration for up to 9-months did not cause test article-related changes in male or female reproductive organs. In summary, the scientific literature and nonclinical data suggest that mechanism-based decreases in sotatercept ligands are unlikely to modulate hormonal signaling in a pro-carcinogenic manner.

Activin A plays a role in the regulation of immune responses and is recognized as an important inflammatory and immunoregulatory cytokine. Activin A, and its antagonist follistatin, are increased during systemic inflammation, and the majority of immune cells can produce and responds to activin A. The response differs between cell types and depending on cell maturation, cell activation status, as well as on the spatial and temporal context of the immune response. Activin A may regulate either pro- or anti-inflammatory responses in macrophages, depending on their prior activation status. Literature data also suggests that activin A can stimulate

antibody production by B cells and can influence the development of regulatory T cells. In contrast, the potential effects of GDF-8 and GDF-11 on immune function are not well described. Despite the potential role of activin signaling in the regulation of immune function, there is no definitive evidence that sotatercept affects immune function. One sotatercept monkey study was terminated early due to the presence of plasmodium infection in many animals and the early death of 1 animal due to fulminant malaria. Plasmodium was present prior to study start, but increased in incidence and severity over the 9-week dosing period. While it is possible that sotatercept-mediated changes in immune function increased the susceptibility of these animals to infection, it is well-recognized that erythropoiesis-promoting drugs can increase plasmodium infection by increasing the population of potential host cells. It is therefore likely that sotatercept-mediated increases in RBC and reticulocytes, and not changes in immune function, increased the susceptibility of the treated animals to plasmodium infection. In the completed sotatercept nonclinical studies, minimal to moderate lymphoid depletion in the thymus occurred in monkeys at dosages ≥ 10 mg/kg Q2W in the 27-week study and in the spleen at dosages ≥ 2.6 mg/kg Q4W in the 9-month study. However, in monkeys and adult rats at all tested doses, there was no evidence of degeneration or necrosis in the thymus or spleen, no adverse findings in other lymphoid tissues, and no meaningful changes in circulating white blood cells. Lymphoid changes in juvenile rats were generally limited to minimal to mild decreases in cellularity in the marginal zone of the white pulp and/or minimal to mild increases in cellularity in the red pulp of the spleen. In the pivotal juvenile rat study, there were no test article-related changes in the TDAR assay and immunophenotyping data did not suggest immune suppression. The totality of the nonclinical data indicate that sotatercept does not have toxicologically meaningful immunomodulatory effects that could impact its carcinogenic potential.

The scientific literature is largely inconclusive regarding the roles of sotatercept ligands and their various intracellular signaling pathways as they relate to tumor biology. Activin A and GDF-11 were shown to induce apoptosis or growth suppression in some contexts and increased proliferation in others. TFG- β , which has structural similarity with activin A and shares significant parts of the signal transduction pathway, has been assigned a dual role in carcinogenesis. Given the pleiotropic ligand binding profile of sotatercept, and the conflicting scientific literature, it is challenging to draw meaningful conclusions regarding the potential of this decoy receptor to negatively or positively affect tumor growth. Similarly, the effects of activin A in cancer immunology are difficult to predict as they are also dependent on cell type/tumor entity as well as the context of the immune response. Potential associations between

	sotatercept ligand receptors (ACVR2A, ACVR2B, activin receptor-like (ALK)1, ALK4, ALK5, and ALK7) and human cancer were evaluated using human genetics databases (Online Mendelian Inheritance in Man [www.omim.org], the Open Targets Genetics portal [https://genetics.opentargets.org]), and human cancer gene databases (COSMIC [https://cancer.sanger.ac.uk], and Intogen [https://www.intogen.org]). Database searches were performed during August and September 2022. No direct association of these receptors with potential human carcinogenic concerns was identified. Together, the sotatercept nonclinical profile and literature data indicate that this biologic molecule does not have genotoxic potential, has anti-proliferative and anti-fibrotic activity in animal models of PAH, did not negatively impact hormones, did not cause immunotoxicity, hyperplasia, or tumor development in animals, and that the receptors involved in sotatercept ligand binding are not directly associated with carcinogenesis in humans. Based on this weight-of-evidence, sotatercept is considered to have low carcinogenic potential.
5) reproductive toxicity and toxic effects on offspring development:	
effect on fertility and early embryonic development	Sotatercept: A GLP Male Fertility Assessment of Sotatercept Administered Once Weekly by Subcutaneous Injection in Sprague-Dawley Rats with a 13- Week Recovery The objective of this GLP study was to test for potential effects on male fertility resulting from Q1W sotatercept treatment of Crl:CD (standard deviation (SD)) male rats before cohabitation, through mating with untreated female rats, and until termination. A treatment-free period of approximately 13 weeks was included to assess reversibility of any potential effects observed during treatment. Thirty male rats/group were administered vehicle or sotatercept at doses of 0.3, 3, or 30 mg/kg SC Q1W for 10 weeks before cohabitation, during cohabitation, and continuing Q1W for 3 weeks following cohabitation (a total of 13 doses). Up to 15 males/group were retained for a 13-week treatment-free period. At least 45 untreated female rats/group were randomly assigned to the four dose groups for mating to treated males. Female rats were not administered vehicle or sotatercept during the course of the study. The following parameters and endpoints were evaluated for all rats: viability, clinical signs, body weights, body weight gains, food consumption, mating and fertility, and macroscopic observations. Male rats were further evaluated for sperm motility, sperm concentration, reproductive organ weights and histopathology, and untreated female rats were further evaluated for estrous cycling and ovarian and uterine contents. Sotatercept exposure in male rats was estimated based on TK

data at 0.3, 3, and 30 mg/kg Q1W. The sotatercept ADA response was determined in control and treated male animals.

There were no sotatercept-related unscheduled deaths. Of the 3 unscheduled deaths, 1 control male was found dead on Study Day 64, one 30 mg/kg Q1W male was found dead during the treatment-free period (Study Day 148) and did not have other signs of toxicity, and one 30 mg/kg Q1W male was euthanized on Study Day 36 due to adverse clinical signs considered unrelated to treatment.

There were no test article-related clinical signs or effects on food consumption.

Test article-related body weight changes were limited to transient decreases in mean body weight gain at all dose levels during Study Days 1 to 8 (-12, -14, and -18% from controls at 0.3, 3, and 30 mg/kg Q1W, respectively).

The fertility index and the pregnancy index were reduced at 30 mg/kg Q1W compared to controls (82.8 % versus 96.6 % in controls for fertility index and pregnancy index) at the end of the dosing period. There were no test article-related effects on fertility or mating during the treatment-free period at any dose level.

Test article-related gross changes were limited to the testis and epididymis and included unilateral or bilateral small size or abnormal consistency at ≥ 0.3 mg/kg Q1W at the terminal and treatment-free period necropsies. These changes correlated with degeneration/atrophy in the testis or decreased cellularity of luminal sperm in the epididymis.

There were no sotatercept-related organ weight changes at either the terminal or treatment-free period time points.

At the terminal necropsy, a spectrum of microscopic changes in the efferent ducts at ≥ 0.3 mg/kg Q1W increased in incidence and severity in a dose-responsive manner, and included minimal to marked sperm granuloma, minimal to mild sperm stasis, minimal fibrosis, minimal to mild mineralization, and/or minimal to mild mixed cell infiltration.

These changes were often unilateral and occasionally bilateral and ranged from small areas of focal mineralization and/or fibrosis within the efferent ducts to larger areas with sperm stasis and a surrounding mixed infiltrate. In several animals, sperm granulomas were present with evidence of occlusion of the efferent ducts. Changes in the seminiferous tubules in rats at ≥ 0.3 mg/kg Q1W were generally associated with efferent duct changes, and included an increased incidence and severity of unilateral or bilateral degeneration/atrophy of the seminiferous tubules with occasional animals at 30 mg/kg Q1W having additional changes including mild tubular dilation, dilation/sperm stasis in the rete testis, and/or sperm granuloma. In these animals, moderate to severe unilateral or bilateral decreased cellularity (decreased luminal sperm) was also present in the epididymis. The testicular and epididymal effects were

considered to be secondary to outflow obstruction at the level of the efferent ducts.

At the treatment-free period necropsy at ≥ 0.3 mg/kg Q1W, microscopic changes in the efferent ducts included mild sperm granuloma, minimal sperm stasis, minimal fibrosis, minimal mineralization, and/or minimal to mild mixed cell infiltration. These changes were often unilateral and occasionally bilateral and ranged from small areas of focal mineralization and/or fibrosis within the efferent ducts to larger areas with sperm stasis and a surrounding mixed infiltrate or a fully formed sperm granuloma. Mixed inflammatory cell infiltrates were also noted within the fat adjacent to the epididymis in several animals. These changes were dose responsive and generally similar to that observed at the terminal necropsy. Associated with the efferent duct effects, rats were occasionally noted to have unilateral or bilateral degeneration/atrophy of the seminiferous tubules with/without tubular dilation, sperm granuloma, sperm stasis, and/or mineralization and decreased epididymal sperm cellularity.

While there was not a notable increase in incidence over controls at the treatment-free period necropsy (as a single control rat presented with similar unilateral changes in the testis and epididymis), the changes observed in the male reproductive tract at all dosages were considered sotatercept-related and adverse due to the increased incidence of efferent duct changes with secondary effects in the testis and epididymis at both terminal and treatment-free period necropsies.

The microscopic features noted in the efferent ducts in this study and in the testes in the 3-month toxicity study, the low incidence of these changes, and the predominately unilateral presentation of these effects, are all consistent with altered fluid dynamics that occurs following blockage of the efferent ducts. In contrast, direct toxic effects to the testes would typically present bilaterally.

Fluid secretion by Sertoli cells in the testis is needed to support sperm viability and allow for sperm transport into the tubular lumen and efferent ductules in the rat reabsorb nearly 90% of the rete testis fluid. The effects observed in the male reproductive tract of sotatercept-treated rats are consistent with obstruction of the efferent ducts and/or blocking the reabsorption of fluid, deleterious increases in back pressure within the lumen of seminiferous tubules in the testis, and secondary pressure-related atrophy in the testes.

Because of anatomical differences in the efferent ducts of rats and humans, the risk of testicular toxicity resulting from efferent duct blockage in humans is low. In contrast to rat efferent ductules that are long and merge into a single duct that enters the epididymis, human efferent ductules are much shorter, do not merge into a single duct, and enter the epididymis at several sites.

Thus, in humans, fluid outflow occurs even if several efferent ductules become occluded or fluid reabsorption is inhibited.

Cauda epididymal sperm density was reduced in the 30 mg/kg Q1W dose group at the end of the dose period compared to controls (-27% from controls). There were no sotatercept-related changes in sperm parameters (vas deferens sperm motility or cauda epididymal sperm density) at the end of the treatment-free period at any dose level.

In summary, the existing data and literature information strongly suggest that rat testicular toxicity resulted from alterations in fluid dynamics secondary to efferent duct obstruction.

Similar testicular effects are unlikely to occur in humans due to anatomical differences in efferent duct structure between rats and humans.

There were no test article-related effects on ovarian or uterine parameters in untreated females bred to treated males. ADAs were detected in 0 of 30 control animals, 16 of 30 (53.3 %) animals at 0.3 mg/kg Q1W, 17 of 30 (56.7 %) animals at 3 mg/kg Q1W, and 18 of 29 (62.1 %) animals at 30 mg/kg Q1W, for a total incidence rate of 57.3 % (51 of 89).

In conclusion, once weekly SC administration of sotatercept to male Sprague Dawley rats for 10 weeks before cohabitation, during cohabitation, and continuing through the day before euthanasia at doses of 0.3, 3, and 30 mg/kg Q1W resulted in test article-related changes at all dose levels. Transient decreases in body weight gain at the beginning of the dose period at all dose levels were not considered adverse. At 30 mg/kg Q1W, reductions in cauda epididymal sperm density, fertility index, and pregnancy index that occurred at the end of the dosing period were not observed at the end of the treatment-free period. Dose responsive microscopic findings were present in the efferent ducts with secondary effects present in the testis and epididymis at all doses in the terminal and treatment-free period time points and were considered adverse (NOAEL for efferent duct/testes changes was < 0.3 mg/kg Q1W).

There were no accompanying reproductive functional deficits to findings in the efferent ducts and testes at ≤ 3 mg/kg Q1W. As a result, only the reproductive functional findings at 30 mg/kg Q1W were considered adverse. Therefore, the reproductive NOAEL was 3 mg/kg Q1W which corresponds to an estimated $C_{\max}$ and AUC_{0-168h} of 20.3 $\mu\text{g/mL}$ and 2960 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, respectively (2-fold the clinical exposure at the MRHD).

Sotatercept: A Fertility and Early Embryonic Development Study in Female Rats Administered Sotatercept Subcutaneously

Twenty-five female Sprague Dawley rats/group were administered vehicle or sotatercept at doses of 5, 15, or 50 mg/kg SC Q1W for 2-weeks prior to mating and continuing through GD 7 (up to a total of 5 doses). An additional 3 (control) to 5 (test

article-treated) females/group were used only for TK determinations and dosed according to the same schedule as the main study animals.

All surviving females that were confirmed to have mated were euthanized and necropsied on gestation day (GD) 13. Untreated males were assigned to each treatment group (25 males/group) and utilized for mating purposes only.

The following parameters and endpoints were evaluated: viability, clinical signs, body weights, body weight gains, food consumption, mating and fertility, organ weights, macroscopic and microscopic observations (limited to the ovaries and uterus with cervix from control and 50 mg/kg Q1W females), estrous cycling, ovarian and uterine contents. TK analysis and immunogenicity (ADA) analysis were performed on control and treated groups.

There were 2 test article-related unscheduled deaths at 50 mg/kg Q1W. These animals were terminated on GD 5 or 8 due to moderate to severe swelling of the hindlimbs that significantly impaired mobility. Macroscopic findings in these animals included enlarged and red adrenal glands and moderate to severe edema of the hindlimbs.

Adverse test article-related changes were observed at ≥ 15 mg/kg Q1W. During the gestation period, five 50 mg/kg Q1W animals had swelling of one or both hindlimbs and/or impaired mobility, and 2 animals with these changes were terminated early in extremis. During the premating period, increased estrous cycle length was noted at 50 mg/kg Q1W (6.7 days vs. 4.6 days in controls) and correlated with a lower mean number of cycles (1.7 vs. 2.4 in controls). Fertility and fecundity indices were lower at 15 mg/kg Q1W (80 % and 83 %, respectively) and at 50 mg/kg Q1W (36 % and 43 %, respectively) compared to concurrent (96 % and 100 %) and historical control data. At 50 mg/kg Q1W, lower mating index (84 %) was observed compared to controls (96 %) and the historical control range for this laboratory.

At 15 and 50 mg/kg Q1W, lower pregnancy rates, increases in pre- and post-implantation loss (including increases in incidences of fully resorbed litters), and reductions in litter size were observed during uterine examination on GD 13. Enlarged and/or discolored adrenal glands at 15 and 50 mg/kg Q1W were noted grossly (microscopic evaluation not performed) and were considered adverse based on similar findings in other rat studies. Lower gravid uterine with cervix weights (absolute and relative to body weight) were observed at 15 and 50 mg/kg Q1W (compared to controls) and were associated with a reduction in the number of viable embryos and an increase in post-implantation loss. Microscopic examination of ovaries and uteri from 50 mg/kg Q1W females determined that there were no changes in these organs (except for the absence of implantation sites in non-gravid uteri).

	The following changes were considered the result of sotatercept administration, but not adverse. Increased mean body weight (up to 7.7 %) and mean body weight gain (up to 2-fold control values) occurred during the pre-mating period at ≥ 15 mg/kg Q1W, and correlated with increased food consumption. Decreases in the mean number of implantation sites (14.5 vs. 16.3 in controls) and in the mean number of viable embryos was observed at 5 mg/kg Q1W (13.7 vs 15.6 per animal in controls). However, the value for each was within the historical control range for the laboratory. Slightly lower gravid uterine with cervix weights (absolute and relative to body weight) at 5 mg/kg Q1W were attributed to the reduced number of viable embryos. Anti-drug antibodies were detected in 1 mid-dose and one high-dose TK group animal. Antibody formation may have lowered the exposure in these animals but did not have an apparent effect on the overall serum profiles for the dose groups. The overall incidence of anti-drug antibodies in the 0, 5, 15, and 50 mg/kg Q1W dose groups was 0/28, 14/30, 12/30, and 6/30, respectively. Based on the early sacrifice of 2 females at 50 mg/kg Q1W, the NOAEL for maternal toxicity was 15 mg/kg Q1W, corresponding to an AUC_{0-168h} of 12,300 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Based on adverse effects observed at 15 and 50 mg/kg Q1W, the NOAEL for female fertility and early embryonic development was 5 mg/kg Q1W, corresponding to an AUC_{0-168h} of 2735 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ (2-fold the clinical exposure at the MRHD).
embryotoxicity	Sotatercept: Subcutaneous Developmental Toxicity Study of Sotatercept in Rats, Including a Satellite Toxicokinetic Evaluation The purpose of this GLP study was to detect adverse effects of sotatercept on presumed-pregnant female Sprague-Dawley rats and development of the embryo and fetus. Twenty-eight presumed pregnant rats/group were administered sotatercept at doses of 5, 15, or 50 mg/kg or vehicle only SC on GD 6 and 13 (a total of 2 doses). Of these animals, six rats/group were designated only for TK evaluation. All surviving female rats were euthanized and necropsied on GD 21. The following parameters and endpoints were evaluated: viability, clinical observations, body weight and body weight changes, food consumption, Cesarean-sectioning observations, gravid uterine weights, fetal gross external, soft tissue and skeletal alterations, fetal body weights and terminal maternal body weights. TK and immunogenicity (ADA) analyses were performed on control and treated groups. All main study rats survived to scheduled sacrifice. On GD 15 (during the period of TK sampling), one 50 mg/kg TK animal aborted and was subsequently terminated. At necropsy, all tissues for this animal were normal. Because of its isolated occurrence, this abortion was not considered test article-related.

	There were no test article-related clinical observations or gross findings. There were no sotatercept-related changes in body weight or body weight gain following the first and second dose (GD 6 to 7 and GD 13 to 14) at any dose level. Body weights, body weight gain, and gravid uterine weights were unaffected in the 5 and 15 mg/kg dose groups. A reduction in body weight gain (compared to control) in the 50 mg/kg dose group from GD 18 to 21 correlated with a non-adverse minimal decrease in food consumption. Reduced body weight gain at 50 mg/kg was considered secondary to a test article-related reduction in gravid uterine weight at this dose level. After correction for gravid uterine weight, maternal body weight on GD 21 and cumulative body weight gain were comparable among the dose groups. There was a test article-related increase in the percentage of post-implantation loss at 50 mg/kg (27.9%), in comparison to the vehicle group (8.8 %). This change reflected an increase in the average number of late resorptions per litter (2.6 late resorptions/litter compared to 0.0 in control), an overall increase in the average number of resorptions per litter (3.6 resorptions/litter compared to 1.2 in control), three dead fetuses (from three litters), and total litter loss in another dam in the 50 mg/kg dose group. Reflecting these increases in post-implantation loss, the averages for litter size and live fetuses were significantly reduced at 50 mg/kg, compared to the vehicle group values. A dose-dependent reduction in fetal body weights occurred at ≥ 5 mg/kg (sexes combined means 9 %, 15 %, and 22 % less than controls). However, the reduction in fetal weight at 5 mg/kg was slight and the mean value was within the historical control range, and therefore, was not considered to be an adverse effect of sotatercept. Reflecting the smaller fetal body weights that occurred in the 15 and 50 mg/kg dose groups, delays in the ossification of the thoracic and lumbar vertebrae, hindlimb metatarsals and/or hindlimb phalanges occurred in these dose groups. In addition, the 50 mg/kg dose group had significant changes in ossification site counts reflecting increases in the incidence of several related variations (supernumerary thoracic ribs with associated significant increases and decreases in the numbers of thoracic and lumbar vertebrae, respectively). No gross external, soft tissues, or skeletal fetal alterations (malformations or variations) were caused by doses of sotatercept as high as 50 mg/kg. Serum sotatercept concentrations were maintained in a dose-dependent manner during the critical period of organogenesis (GD 6 to 16), following two weekly injections. On GD 13, pre-dose sotatercept concentrations were at least 20 % of the GD 6 C_{max} at each dose level.
--	---

After the second dose on GD 13, sotatercept levels reached a plateau level through GD 16 and then rapidly declined by GD 18, resulting in decreases in AUC_{0-168h} in the 5 and 15 mg/kg dose group. It is likely that ADAs contributed to the rapid clearance after the second dose.

Antibodies to sotatercept were detected in 64 % of the treated main study rats and 83% of the treated satellite TK rats. The development of anti-sotatercept antibodies following the second injection did not significantly reduce serum levels of sotatercept prior to GD 18.

On the basis of these data, the maternal NOAEL for sotatercept was 50 mg/kg, corresponding to an AUC_{0-168h} of 19,885 µg*h/mL. At ≥15 mg/kg, reduced fetal weights and delays in skeletal ossification were observed. At 50 mg/kg only, there was an increase in late fetal lethality associated with an overall increase in post-implantation loss and a reduction in live litter size, as well as an increase in the incidence of supernumerary ribs with corresponding increases and decreases in thoracic and lumbar vertebrae, respectively. Therefore, based on the adverse magnitude of decreased fetal weights at 15 mg/kg, the developmental NOAEL was 5 mg/kg, corresponding to an AUC_{0-168h} of 2642 µg*h/mL (2-fold the clinical exposure at the MRHD).

Sotatercept: Subcutaneous Dosage-Range Developmental Toxicity Study of Sotatercept in Rabbits, Including a Satellite Toxicokinetic Evaluation

The purpose of this study was to provide information for the selection of doses to be used in the pivotal developmental toxicity (embryo-fetal toxicity and teratogenic potential) study of sotatercept administered subcutaneously to New Zealand White presumed-pregnant female rabbits.

Five presumed pregnant New Zealand White rabbits/group were administered sotatercept at doses of 5, 15, or 50 mg/kg or vehicle only SC on GD 7 and 14 (a total of 2 doses). An additional 3 rabbits/group in the 5, 15, and 50 mg/kg groups were similarly dosed and dedicated for TK evaluation. All surviving animals were euthanized and necropsied on GD 29.

The following parameters and endpoints were evaluated: viability, clinical observations, body weights, body weight changes, food consumption, hematologic parameters, necropsy observations, Cesarean-sectioning and litter observations, fetal body weights, fetal sex, and fetal gross external alterations. TK and immunogenicity (ADA) analyses were performed on treated groups, and pooled fetal blood concentrations were determined in pups from treated animals.

Two rabbits in the 50 mg/kg dose group that were assigned to the main study were humanely euthanized on GD 23 because of adverse clinical signs that generally included scant feces, red substance in cage pan, ungroomed coat, and/or cold to touch.

Additional changes prior to termination included body weight loss and decreases in food consumption. Abortions (animals were subsequently euthanized) occurred in one rabbit in the 5 mg/kg dose group and two rabbits in the 50 mg/kg dose group, each assigned to the TK portion of the study. Rabbits that aborted had clinical presentations similar to main study animals that were euthanized. These mortalities and abortions were presumed related to the sotatercept.

In surviving animals, adverse test article-related clinical observations included red substance in the cage pan in three of five rabbits in the 50 mg/kg dose group and red discolored and/or swollen eyelids in three and two rabbits in the 15 and 50 mg/kg dose groups, respectively.

At necropsy, fluid was observed in the pericardial sac of the heart of one 5 mg/kg, one 15 mg/kg, and three 50 mg/kg rabbits.

Body weight loss occurred at 15 mg/kg for the entire post dose period (GD 15 to 29) and body weight gains were reduced in the 50 mg/kg dose group during this same period. The overall reduction in body weight gain at 50 mg/kg reflects a loss in body weight from GD 15 to 20 and suppressed body weight gain from GD 25 to 29, in comparison to control. Overall, body weight gain was reduced in the 15 and 50 mg/kg dose groups for the combined dose and post-dose periods (GD 7 to 29), in comparison to control.

Post-implantation loss (ie, early and late resorptions and the percentage of post-implantation loss) was increased at 15 and 50 mg/kg, in comparison to control. One dam in the 50 mg/kg dose group had a litter of all resorbed conceptuses. Reflecting these increases in post-implantation loss, the averages for litter size and live fetuses were reduced and the percentage of resorbed conceptuses per litter was increased in the 15 and 50 mg/kg dose groups, as compared to control.

Fetal body weights (male, female, and combined) were reduced at ≥ 5 mg/kg (combined fetal body weights were 14 %, 35 %, and 23 % less than controls in the 5, 15, and 50 mg/kg groups, respectively).

There were no other litter parameters, and no Cesarean-sectioning, food consumption, or hematology changes at sotatercept doses as high as 50 mg/kg. The litter averages for corpora lutea, implantations, and percent live male fetuses were comparable among the four dose groups. In animals that survived to scheduled termination, there were no dead fetuses. All placentae appeared normal.

Sotatercept serum concentrations were maintained, in a dose-dependent manner, in pregnant rabbits for 2 consecutive weeks. The mean AUC ratio (Week 2/Week 1) was 1.01 indicating there was no accumulation when dosed Q1W.

Sotatercept was detected in pooled fetal serum samples at each dose level on GD 29 indicating that by the end of gestation sotatercept can cross the placental barrier. The fetal

concentrations ranged from 1 % to 39 % of maternal serum concentrations.

ADAs were detected in one 5 mg/kg rabbit on GD 14 only and had no apparent effect on sotatercept serum concentrations in that animal.

Based on these data, sotatercept doses ≤ 15 mg/kg, administered SC on GD 7 and 14, were recommended for the developmental toxicity study in pregnant rabbits.

Sotatercept: A GLP Embryo-Fetal Development Study of Sotatercept Administered Once Weekly by Subcutaneous Injection in Rabbits

The objectives of this GLP study were to detect adverse effects of sotatercept on pregnant New Zealand White females and development of the embryo and fetus.

Twenty presumed pregnant New Zealand White rabbits/group were administered vehicle or sotatercept at doses of 0.5, 1.5, or 5 mg/kg SC on GD 7 and 14 (a total of 2 doses). An additional 3 rabbits/group were used for TK and ADA determinations. All rabbits were euthanized and necropsied on GD 29. The following parameters and endpoints were evaluated: viability, clinical signs, body weights, body weight gains, food consumption, gross necropsy findings, ovarian and uterine examinations, fetal body weight and sex, and fetal external, visceral, coronal, and skeletal examinations. TK and immunogenicity (ADA) analyses were performed on control and treated groups.

All rabbits survived to scheduled euthanasia and there were no test article-related effects on maternal parameters at any dose level.

Increased mean post-implantation loss resulted in a lower mean number of live fetuses at 5 mg/kg. In addition, dose-dependent lower mean fetal weight (male, female, and combined) was observed in the 1.5 and 5 mg/kg groups (combined weights 13 % and 18 % less than controls, respectively) that correlated with lower mean numbers of ossification sites (metacarpals, forelimb phalanges, and hindlimb phalanges) at 5 mg/kg.

No sotatercept-related fetal abnormalities (malformations or variations) were noted in any dose group.

The majority of anti-sotatercept antibodies were detected on GD 29 after the second dose. Antibodies were detected in 1/23 (4.3 %) control animals, 10/23 (43.5 %) animals dosed at 0.5 mg/kg, 10/23 (43.5 %) animals dosed at 1.5 mg/kg, and 8/23 (34.8 %) animals dosed at 5 mg/kg. The total incidence rate in sotatercept dosed animals was 40.6 %. In the TK subset, ADAs in one 0.5 mg/kg animal and two 1.5 mg/kg animals appeared to have an impact on sotatercept exposure on GD 14.

In conclusion, the maternal NOAEL in pregnant rabbits administered sotatercept by SC injection once on GD 7 and 14 (total of 2 doses) was 5 mg/kg, which corresponded to a maternal AUC_{0-366h} of 10,900 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Developmental toxicity (higher

	mean post-implantation loss, lower mean number of live fetuses, lower mean fetal weight, and lower mean number of ossification sites) was observed at 5 mg/kg. In addition, lower mean fetal weight was noted in the 1.5 mg/kg dose group. Based on these results, the developmental NOAEL was considered to be 0.5 mg/kg, corresponding to a maternal AUC_{0-366h} of 1070 µg*h/mL (0.4-fold the clinical exposure at the MRHD) following dosing on GD 14.
prenatal and postnatal toxicity	Sotatercept: A GLP Developmental and Perinatal/Postnatal Reproductive Study of Sotatercept by Subcutaneous Injection in Rats, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation The objectives of this study were to detect sotatercept-related adverse effects on Sprague Dawley rats and development of the offspring. Because manifestations of effects induced during this period may be delayed, observations were continued through sexual maturity of the F1 generation rats. In addition, the ADA effects of sotatercept to the F0 generation females were determined. A total of 132 time mated female Sprague Dawley rats were randomly assigned to 6 dose groups of 22 rats per group. Because ADA formation in rats following repeated dosing is known to decrease systemic exposure, F0 generation maternal rats in this study were treated with sotatercept either during gestation or during the lactation period. Presumed pregnant female rats were administered sotatercept, and/or surrogate (saline) and the vehicle control, SC on GD 6 and 13, or lactation day (LD) 1, 8, and 15. F0 female rats treated during the gestation period (two groups) were dosed with sotatercept at 1.5 or 5 mg/kg, respectively, on GD 6 and 13 followed by a saline dose on LD 1, 8, and 15. F0 female rats treated during the lactation period (three groups) were dosed with saline on GD 6 and 13 followed by sotatercept at 1.5, 5, or 10 mg/kg, respectively, on LD 1, 8, and 15. F0 generation control rats were dosed with saline on GD 6 and 13 followed by doses of vehicle on LDs 1, 8, and 15. F0 generation female rats were allowed to deliver naturally. On LD 21, F1 generation males and females were weaned and 264 pups (1/F0 group/sex/litter) were selected for continuation on study for the assessment of any potential effects on growth and behavior. All dams, and any pups not selected for continued evaluation, were euthanized on LD 21 postpartum. F1 generation rats were not directly administered sotatercept, saline or control article during the course of the study. The following parameters and endpoints were evaluated in all F0 generation rats: viability, clinical signs, body weights, body weight gains, food consumption, natural delivery and maternal observations, ovarian and uterine examinations, and macroscopic observations.

	Blood samples were collected from all F0 generation rats before initiation of dosing on GD 6 (Groups 1 to 3 only) and on LD 1 and prior to necropsy on LD 21 (all groups) for anti-sotatercept-antibody evaluations. The following parameters and endpoints were evaluated in all F1 generation rats: viability, clinical signs, body weights, sexual maturation, motor activity, acoustic startle habituation, learning and memory (Morris Water Maze), mating, ovarian and uterine examinations, and macroscopic observations. All F0 generation females survived to the scheduled euthanasia. No sotatercept-related effects were observed in the F0 generation females during the gestation or lactation periods for any of the following parameters: clinical signs, mean maternal body weights or body weight gains, natural delivery, maternal behavior, and macroscopic observations. Test article-related changes in F0 females were limited to a decrease in mean maternal food consumption from LD 10 to 15 for the 10 mg/kg maternal lactation dose group that was not considered adverse in the absence of correlative clinical signs or body weight effects. No litter effects were observed in the F0 generation at any dose level administered during gestation or lactation as evaluated by the number of dams delivering litters, the duration of gestation, implantation sites per delivered litter, the gestation index (percentage of pregnancies that result in birth of live litters), the number of liveborn and stillborn pups, the viability index (percentage of pups that survived from birth to LD 4), the lactation index (percentage of pups born that survived to weaning), surviving pups per litter, the sex ratio, and live litter size at weighing. In F0 animals dosed during gestation (bled on LD 1 and 21) or dosed during lactation (bled on LD 21 only), ADA were detected in 2/22 (9.1 %) animals in the control group, 7/22 (31.8 %) animals in the 1.5 mg/kg gestation group, 16/22 (72.7 %) animals in the 5 mg/kg gestation group, 4/21 (19.0 %) animals in the 1.5 mg/kg lactation group, 7/20 (35.0 %) animals in the 5 mg/kg lactation group, and 3/21 (14.3 %) animals in the 10 mg/kg lactation group, for a total antibody incidence rate of 34.9 % (37 of 106) in the sotatercept-treated animals. During the preweaning and postweaning periods, no test article-related deaths or adverse clinical observations were observed in the F1 generation male and female offspring for any maternal dose group. During the preweaning period in pups from dams treated during gestation with 1.5 and 5 mg/kg sotatercept, transient test article-related decreases in mean pup body weights (male, female, and sex combined, compared to control) were noted on postnatal day (PND) 1 only and were not considered adverse. In pups from dams treated during lactation at ≥ 5 mg/kg, there were reductions in body weight and body weight gain that were
--	---

dose dependent (in magnitude and timing of onset). Mean pup body weights were reduced prior to weaning in males at 5 mg/kg (beginning on PND 15; 9 % to 13 % less than controls) and in both males and females at 10 mg/kg (beginning on PND 8 and 10, respectively; 9 % to 20 % less than controls), and in females at 5 mg/kg, mean body weights were reduced by the end of the preweaning period (9 % less than controls on PND 21). In these pups, reductions in body weight and body weight gain continued during the postweaning period. The postweaning reductions in body weight gain occurred during several measured intervals in the males and females at 5 mg/kg such that body weight gain over the entire postweaning period was reduced (11 % less than controls from PND 22 to 106 for males; 4 % less than controls from PND 22 to 92 for females). Similarly, postweaning reductions in body weight gain in males and females at 10 mg/kg occurred during all (males) or the majority (females) of the measured intervals such that body weight gain over the entire postweaning period was reduced (15 % less from PND 22 to 106 in males and 8 % less from PND 22 to 92 in females). As a result, mean body weights remained reduced throughout the postweaning period in the 5 mg/kg (11 % less than controls in males on PND 106; 5 % less in females on PND 92) and 10 mg/kg (16 % less in males on PND 106; 10 % less in females on PND 92). In addition, although mean body weight gain in the 10 mg/kg females was similar to controls during the gestation period, mean body weights remained reduced during gestation (8 % less than controls) due to the prior reduction in gains. Taken together, results reflect sotatercept-related reductions in body weight and body weight gain at 5 and 10 mg/kg beginning prior to weaning and continuing into the postweaning period, which resulted in reduced mean body weights into adulthood. Therefore, these effects are considered adverse.

Delays in sexual maturation were observed in F1 animals in the maternal lactation groups at ≥ 5 mg/kg, secondary to decreases in pup body weights in these dose groups. In the F1 generation, an increase (compared to control) in the mean day of preputial separation occurred in males in the 5 and 10 mg/kg maternal lactation dose groups (+3.1 and +3.5 days, respectively) and in the mean day of vaginal patency in females in the 10 mg/kg maternal lactation dose group (+2.4 days). No effects on sexual maturation were observed in the 1.5 mg/kg maternal lactation dose group, and no changes were observed in the F1 generation when F0 generation rats were dosed during the gestation phase. Furthermore, there were no effects on male or female reproductive performance in F1 animals at any dose level from either maternal segment.

No test article-related effects were observed during the acoustic startle, motor activity and Morris Water Maze evaluations.

No sotatercept-related effects were observed in the F1 generation from either maternal segment at macroscopic necropsy

	examination, and there were no changes in ovarian and uterine parameters as evaluated by number of corpora lutea, implantations, the percentage of preimplantation loss, viable and nonviable embryos, and the percentage of post-implantation loss. In conclusion, sotatercept was well-tolerated in pregnant female rats when administered SC at doses of 1.5 and 5 mg/kg on GD 6 and 13, or at doses of 1.5, 5, and 10 mg/kg on LD 1, 8, and 15. Test article-related F0 maternal effects were limited to a transient non-adverse decrease in food consumption in the 10 mg/kg lactation group. Therefore, the maternal NOAEL for sotatercept was 5 mg/kg or 10 mg/kg when administered during gestation or lactation, respectively, and the reproductive NOAEL is 5 mg/kg when administered during gestation and 10 mg/kg when administered during lactation. Adverse sotatercept-related effects on pup body weight, pup body weight gain, and/or sexual maturation occurred in both the F1 generation male and female offspring from the 5 and 10 mg/kg maternal lactation dose groups. There were no F1 generation effects related to the maternal administration of sotatercept on pup mortality, clinical signs, motor activity, learning and memory (acoustic startle or Morris Water Maze), mating and fertility, or ovarian and uterine parameters. On the basis of these data, the NOAEL for viability and growth in the offspring when sotatercept is administered to pregnant rats during gestation or lactation was 5 mg/kg (2-fold the clinical exposure at the MRHD) and 1.5 mg/kg (0.6-fold the clinical exposure at the MRHD), respectively.
studies in which the drug is administered to offspring (immature animals) and/or the long-term action is evaluated	Sotatercept: A Twelve-Week Toxicity Study of Sotatercept Administration by Subcutaneous Injection in Juvenile Rats, Including a Recovery Period The objective of this GLP study was to determine the potential effects of sotatercept on growth and development, neurobehavioral development, immune competence, and reproductive function when administered to juvenile Sprague-Dawley rats Q1W by subcutaneous injection from PND 7 to 91 and following a 13-week treatment-free period. Sotatercept was administered SC to juvenile Sprague Dawley rats Q1W beginning on PND 7 and continuing through PND 91 for a total of 13 doses. Sotatercept was administered at doses of 0 (vehicle), 0.3, 3, or 30 mg/kg Q1W. Ten animals/sex/group (Main Study Animals, Subset 1) and 20/animals/sex/group (Treatment-Free Period Animals, Subset 2) were assigned to assess toxicity endpoints on PND 98 (end of the dosing period) and on PND 238 or 239 (end of the 13-week treatment-free period), respectively. Separate groups of animals were treated and used to determine sotatercept TK parameters and ADA (21-24 animals/sex/group, Subset 3) and to evaluate the TDAR and perform immunophenotyping assessments (20 rats/sex in the 0, 0.3 and 3 mg/kg Q1W groups, Subset 4). Juvenile rats were assessed for mortality, clinical signs, and changes in food consumption, body weights, sexual maturation,

motor activity, functional observational battery (FOB) and Morris Water Maze endpoints, estrous cycle duration, reproductive capacity, blood hormone concentrations (FSH, LH, testosterone, progesterone, estradiol, and erythropoietin (EPO)), TDAR and immunophenotyping parameters, bone (femur) density, and clinical and anatomic pathology endpoints. Serum TK (control and treated animals) and ADA assessments were performed.

There were no test article-related changes in urinalysis, EPO, FOB parameters, or changes in performance in the Morris watermaze.

The 30 mg/kg Q1W dose group was terminated on PND 30 (after 3 doses) due to a high number of test article-related unscheduled deaths and the declining clinical condition of remaining animals. At 30 mg/kg Q1W, dehydration, thin body appearance, decreased motor activity and/or ungroomed coat were commonly observed and correlated with decreased body weight gain. Clinical pathology changes at 30 mg/kg Q1W generally included increases in erythroid mass that were pharmacologically-mediated, increases in liver transaminases, and changes in parameters indicative of kidney injury. Test article-related postmortem findings at 30 mg/kg Q1W generally included red discoloration of the kidneys noted grossly, and histomorphologic changes that included tubular dilation/atrophy/hypoplasia/mineralization in kidney, hemorrhage/congestion in the renal medulla, adrenal congestion/vacuolation, mineralization of the glandular stomach mucosa, and decreased cellularity of the white pulp and/or marginal zone in the spleen.

There were no test article-related unscheduled deaths at ≤ 3 mg/kg Q1W in animals designated for TK and ADA determinations (subset 3 animals) or TDAR and immunophenotyping (subset 4 animals).

At 3 mg/kg Q1W in Main Study Animals during the dosing period, test article-related antemortem findings were similar but generally less severe than those present at 30 mg/kg Q1W. At 3 mg/kg Q1W in Main Study Animals, there were test article-related unscheduled deaths, adverse clinical signs, reductions in mean body weights and body weight gain in females (transient) and males, and reduced food consumption in males. Other antemortem changes at 3 mg/kg Q1W during the dosing period included delays in sexual maturation in males and females that were considered secondary to effects on body weights, and a decrease in the total time spent in movement during the motor activity assessment in males. At 0.3 mg/kg Q1W during the dosing period in Main Study Animals, clinical signs were limited to transient limited use of a limb.

Test article-related clinical pathology changes in Main Study Animals during the dosing period at ≥ 0.3 mg/kg Q1W included minimal to mild increases in parameters indicative of erythrocyte

mass. At 3 mg/kg Q1W, additional changes included minimal increases in white blood cell parameters, minimal increases in fibrinogen, and minimal decreases in platelets.

Changes in clinical chemistry parameters indicative of renal toxicity (mild increases in blood urea nitrogen, creatinine, and/or phosphorous and mild decreases in albumin) at ≥ 0.3 mg/kg Q1W correlated with microscopic findings in the kidneys.

At scheduled euthanasia on PND 98 for Main Study animals (0, 0.3, and 3 mg/kg Q1W), sotatercept-related effects were observed at ≥ 0.3 mg/kg Q1W and included gross findings in the testes (abnormal consistency and small in size), prostate (small in size), and/or kidneys (discoloration, fluid filled cysts). Organ weight changes included decreased heart weight in males at ≥ 0.3 mg/kg, decreased weights of the testes/epididymis, prostate, and spleen (females only) at 3 mg/kg Q1W, and increased kidney weights at 3 mg/kg Q1W.

On PND 98 for Main Study animals, histomorphologic findings were present in the kidneys at ≥ 0.3 mg/kg Q1W and included minimal to mild mineralization of the tubules, minimal to marked tubule dilatation, minimal to moderate chronic progressive nephropathy, minimal to moderate membranoproliferative glomerulonephritis, minimal to mild hemorrhage, minimal to moderate atrophy/hypoplasia of the tubules in the medulla, and increases in stroma in the medulla. Minimal to mild mineralization of the glandular mucosa of the stomach was observed in males at ≥ 0.3 mg/kg Q1W and females at 3 mg/kg Q1W. Marked to severe degeneration and atrophy of the seminiferous tubules and mild to moderate edema in the testes was observed at ≥ 0.3 mg/kg Q1W. Minimal to mild hyperplasia of Leydig cells occurred in the testes at 3 mg/kg Q1W. In the prostate and seminal vesicles, minimal to mild atrophy was observed at 3 mg/kg Q1W. A marked reduction in sperm with minimal to mild increased cellular debris was noted in the epididymides at ≥ 0.3 mg/kg Q1W and considered secondary to degeneration/atrophy of the testes. In the spleen, decreased cellularity in the periarteriolar sheaths and/or marginal zones of the white pulp, decreased extramedullary hematopoiesis in the red pulp, and/or increased cellularity in the red pulp was noted in males at 3 mg/kg Q1W and in females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W. In bone marrow of females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W, decreased numbers (islands) of immature (blast) myeloid elements were observed with relative or absolute increased erythroid elements and neutrophils. In the thymus of a few females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W, increased single cell necrosis was observed in the cortex and medulla. Lastly, in females only, there was hypertrophy of the cells in the cortex of the adrenal gland at ≥ 0.3 mg/kg Q1W and in the pars distalis/pars intermedia of the pituitary gland at 3 mg/kg Q1W.

During the treatment-free period, there was 1 test article-related unscheduled death at 3 mg/kg Q1W. Clinical signs and

postmortem findings were generally similar to those present in 3 mg/kg Q1W animals that died during the dosing period. There were no test article-related unscheduled deaths at 0.3 mg/kg Q1W during the treatment-free period.

There were no test article-related clinical signs at ≤ 3 mg/kg Q1W during the treatment-free period (excluding those present in unscheduled death animals).

In males only, reductions in body weights at 3 mg/kg Q1W persisted into the treatment-free period but had fully recovered prior to cohabitation.

There were no changes in food consumption at ≤ 3 mg/kg Q1W during the treatment-free period.

In treatment-free period animals on PND 237-239, test article-related clinical pathology changes were generally minimal to mild and limited to increases in erythroid mass in females at 3 mg/kg Q1W, decreases in platelets in 3 mg/kg Q1W females, increases in fibrinogen in 3 mg/kg Q1W males, decreases in albumin in males at 3 mg/kg Q1W, and increases in cholesterol at ≥ 0.3 mg/kg Q1W. On GD 13, clinical pathology changes in sotatercept-treated females that were mated during the treatment-free period were limited to minimal increases in ALT, AST, and glucose at 3 mg/kg Q1W, and mild increases in cholesterol at ≥ 0.3 mg/kg Q1W.

During the treatment-free period, reductions occurred in male and female fertility indices, in pregnancy rates in untreated females mated to treated males at 3 mg/kg Q1W, and in pregnancy rates in treated females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W. In sotatercept-treated females, there was also an increase in the percentage of animals with nonviable embryos (including 1 litter with only nonviable embryos) at 3 mg/kg Q1W.

At the end of the treatment-free period (PND 238/239), sotatercept-related postmortem effects in Treatment-Free Period Study animals at ≥ 0.3 mg/kg Q1W were similar to those observed at the end of the dosing period and included gross findings in the testes and kidneys, organ weight changes in the testes, prostate, kidneys, and heart, and microscopic findings in the kidneys, stomach, testes (with the exception of Leydig cell hyperplasia), and spleen. In the adrenal gland in females at 0.3 mg/kg Q1W, cortical hypertrophy was no longer present but there was an increased incidence of cystic degeneration at 3 mg/kg Q1W. There were no findings in the pituitary, bone marrow, or thymus.

Slight changes in blood hormone concentrations were noted at 3 mg/kg Q1W only. At the end of the dosing period, there was an increase in LH in males and decreases in LH and FSH in females. At the end of the treatment-free period there were increases in LH and FSH in males only. These changes were of uncertain relationship to treatment and were not considered toxicologically significant.

As a measure of bone density, bone mineral content (BMC) and bone mineral density (BMD) (global, proximal, mid, and distal femur) were slightly increased at 0.3 mg/kg Q1W at the end of the dose period in Main Study animals, with no concurrent effects on hormones. Although the differences were small and not dose-dependent at 0.3 mg/kg Q1W, the differences were consistent among males and females and were likely related to sotatercept. At the end of the treatment-free period, global and proximal BMD and mid femur BMC and BMD were statistically significantly lower in males at 3 mg/kg Q1W, but were considered to be of uncertain relationship to sotatercept treatment.

Following weekly dosing for 12 weeks, sotatercept exposure across the dose range (0.3 to 3 mg/kg Q1W) increased by 1.7- to 3.2-fold in males and 1.5- to 3.8-fold in females.

ADAs were not detected in animals tested on PND 128. However, ADAs were detected in 1 female at 0.3 mg/kg Q1W and 1 female at 3 mg/kg Q1W on GD 13, and in 1 male on PND 239 at 3 mg/kg Q1W. At some timepoints, elevated levels of circulating sotatercept may have interfered with the detection of ADAs, leading to false negative results.

The TDAR and immunophenotyping assessments were performed during the dosing period and the treatment-free period. During the dosing period, there was a decrease in the T-dependent IgM antibody response to KLH, but no change in IgG antibody response, at 3 mg/kg Q1W. In the 2 to 6 animals/sex/group remaining during the treatment-free period there was no discernible effect on KLH-specific IgM or IgG production at ≤ 3 mg/kg Q1W.

Test article-related changes in the immunophenotyping assessments included a dose-dependent trend of increased (statistically significant) CD45+ lymphocyte counts observed on PND 56 in males and females at ≥ 0.3 mg/kg Q1W, relative to the control group that resulted in dose-dependent increases in absolute counts for total T cells, B cells, CD4+ T cells, and CD8+ T cells in males and females. Natural killer (NK) cell absolute counts were not significantly different in sotatercept-treated groups; however, increased absolute CD45+ lymphocyte counts resulted in statistically significant decreases in NK cell percentages for males at 3 mg/kg Q1W and females at 0.3 and 3 mg/kg Q1W. T cell percentages were statistically significantly lower in females that received 0.3 and 3 mg/kg Q1W; however, absolute T cell counts in these animals were increased overall compared to controls. B cell percentages were statistically significantly higher in males that received 3 mg/kg Q1W, which, together with increased CD45+ lymphocyte counts, increased B cell absolute counts in this group, relative to controls. T:B cell ratios displayed a statistically significant trend of less T cells in proportion to B cells in males administered sotatercept on PND 237 only. Overall, dynamic changes in subsets of lymphocyte

were observed at ≥ 0.3 mg/kg Q1W. These minimal to mild changes (2-3 fold in B cells, and < 2 fold in total lymphocyte, T, and NK cells) reflected a slight and transient effect in lymphocyte activation after antigen (KLH) administration and were of minimal toxicological significance.

Due to the small number of animals remaining for the treatment-free period assessments (2 to 6 animals/sex/group), recovery for immunophenotyping changes could not be definitely determined. In conclusion, based on adverse clinical pathology and postmortem changes that did not demonstrate reversibility, and on decreases in female fertility and pregnancy indices occurring during the treatment-free period, the NOEL and NOAEL for this study were < 0.3 mg/kg Q1W (< 0.6 -fold the clinical exposure at the MRHD).

Sotatercept: A Thirteen-Week Toxicity Study of Sotatercept Administered by Subcutaneous Injection in Juvenile Rats, Including a Recovery Period

The objective of this GLP study was to determine the potential effects of sotatercept on growth and development, neurobehavioral development, immune competence, and reproductive function when administered to juvenile Sprague-Dawley rats Q1W by SC injection from PND 7 to 91 followed by an 18-week treatment-free period.

Sotatercept was administered SC to juvenile Sprague Dawley rats Q1W beginning on PND 7 and continuing through PND 91 for a total of 13 doses. Sotatercept was administered at doses of 0 (vehicle), 1, 3, or 10 mg/kg Q1W. Toxicity endpoints were assessed in 10 animals/sex/group (Main Study Animals, Subset 1) through the end of the dosing period on PND 98 and in 20/sex/group (Treatment-Free Period Animals, Subset 2) through the end of the 18-week treatment-free period on GD 15 for females and PND 233 for males. Rats in Subset 1 received an additional dose on PND 98. Separate groups of animals were treated and used to determine sotatercept TK parameters and ADA (24 animals/sex/group and 1 control group composed of 6 rats/sex, Subset 3) and to evaluate the TDAR and perform immunophenotyping assessments (20 rats/sex/group, Subset 4). Juvenile rats were assessed for mortality, clinical signs, and changes in food consumption, body weights, sexual maturation, motor activity, FOB and learning and memory (Biel maze) endpoints, estrous cycle duration, reproductive capacity, blood hormone concentrations (FSH, LH, testosterone, progesterone, estradiol, and EPO), TDAR and immunophenotyping parameters, bone (femur) density, and clinical and anatomic pathology endpoints. Serum TK (control and treated animals) and ADA assessments (treated animals only) were performed.

There were no test article-related unscheduled deaths, and no changes in motor activity, learning and memory (Biel maze) assessments, or GD 15 measures of intrauterine embryo survival

(pre-implantation loss, post-implantation loss, and mean number of viable embryos, corpora lutea, and implantation sites).

Test article-related findings occurred at all dose levels during the dosing period. In Main Study animals, there was an increased incidence of swollen hindlimbs/limited use of hindlimbs at 10 mg/kg Q1W, decreases in body weights and food consumption in males at ≥ 1 mg/kg Q1W, and delays in sexual maturation in males at ≥ 1 mg/kg Q1W and females at ≥ 3 mg/kg Q1W. In the FOB assay, decreases in hindlimb grip strength occurred in males at ≥ 3 mg/kg Q1W.

Test article-related clinical pathology changes in Main Study animals during the dosing period generally included small increases in parameters indicative of erythrocyte mass (RBC, HGB, HCT, absolute reticulocyte count, RDW, hemoglobin distribution width (HDW)), and small decreases in MCH, MCHC, MCV, and/or platelets at ≥ 1 mg/kg Q1W, and very small increases in mean platelet volume (MPV) and fibrinogen at 10 mg/kg Q1W. Chemistry changes included very small increases in alkaline phosphatase in females at ≥ 1 mg/kg Q1W and changes suggestive of renal toxicity (small increases in BUN and chloride [based on individual animals] at ≥ 1 mg/kg Q1W, and increases in creatinine, and/or phosphorus, and minimal decreases in albumin, globulin, and/or total protein that usually occurred at ≥ 3 mg/kg Q1W) that generally correlated with increased positive protein reaction in urine at ≥ 3 mg/kg Q1W and decreases in urine specific gravity and increased urine volume at 10 mg/kg Q1W and microscopic changes in the kidneys.

At scheduled euthanasia of Main Study animals (subset 1) on PND 98, test article-related changes included gross findings in the testes and epididymides (soft consistency and small in size) at ≥ 1 mg/kg Q1W and the kidneys (dilated pelvis and nodules) at ≥ 3 mg/kg Q1W.

Organ weight changes included decreases in heart, epididymides, and prostate weights and increases in ovary weights at ≥ 1 mg/kg Q1W. Decreases in testes weights occurred at ≥ 3 mg/kg Q1W. On PND 98 for Main Study animals, histomorphologic findings were present in the spleen at ≥ 1 mg/kg Q1W and included minimal to mild decreased cellularity of the marginal zone lymphoid tissue and minimal to moderate increased cellularity of the red pulp at ≥ 1 mg/kg Q1W. In kidneys at ≥ 1 mg/kg Q1W, findings included minimal to moderate chronic progressive nephropathy and membranoproliferative glomerulonephritis, minimal to severe atrophy/hypoplasia of medullary/papillary tubules (with increased stroma), mild papillary necrosis, minimal to moderate tubular and pelvic dilatation, and minimal to moderate hemorrhage. Minimal mineralization of the glandular mucosa of the stomach was observed at ≥ 1 mg/kg Q1W. An increased incidence of minimal to mild periportal hepatocellular vacuolation occurred at ≥ 1 mg/kg Q1W. In the adrenal cortex,

mild to severe necrosis occurred at ≥ 3 mg/kg Q1W and minimal to moderate hypertrophy of the zona fasciculata occurred at ≥ 1 mg/kg Q1W. Moderate to severe bilateral testicular tubular degeneration and reduced luminal sperm, and minimal to mild luminal cellular debris in the epididymides occurred at ≥ 1 mg/kg Q1W.

During the treatment-free period in Main Study animals (Subset 2), there were no test article-related deaths, and clinical signs were limited to impaired use of hindlimbs and/or swollen hindlimbs that occurred at 10 mg/kg Q1W. Mean body weights in males remained decreased throughout the treatment-free period at ≥ 1 mg/kg Q1W and generally correlated with decreases in food consumption. Changes in grip strength noted in the FOB during the dosing period had resolved in treatment-free period animals.

At the end of the treatment-free period, there were no test article-related hematology or coagulation changes. Test article-related clinical pathology changes were limited to increased blood urea nitrogen, increased urine volume, and decreased urine specific gravity in males at ≥ 3 mg/kg Q1W, and increases in creatinine and phosphorus and decreases in chloride in one 3 mg/kg Q1W male that were considered potentially related to treatment based on correlative kidney changes.

During the treatment-free period, lower mean mating, fertility, and copulation indices occurred in sotatercept-treated males at ≥ 1 mg/kg Q1W when paired with untreated (naïve) females. There were no test article-related changes in estrous cycle length or reproductive performance parameters in sotatercept-treated females paired with naïve males.

At the end of the treatment-free period, gross changes persisted in the kidneys, testes and epididymides. Organ weight changes in the ovary and prostate had resolved by the treatment-free period necropsy, and an increase in kidney weight was observed in 10 mg/kg Q1W females in addition to existing changes in heart, testes, and epididymides weights.

Histomorphologic changes observed at the end of the treatment-free period were generally similar to those observed at the earlier necropsy with the general exceptions that minimal to moderate atrophy of the zona fasciculata/zona reticularis was present in the adrenal gland and minimal to mild chronic interstitial inflammation in the kidney at ≥ 1 mg/kg Q1W and decreased cellularity of the splenic marginal zone, dilatation of the renal pelvis, and periportal hepatocellular vacuolation had resolved.

In samples collected for hormone analysis at the end of the dosing period (during estrus for females beginning on PND 92 and on PND 97 for males), test article-related changes were limited to small decreases in FSH in females at ≥ 3 mg/kg Q1W and in FSH and estradiol in males at 10 mg/kg Q1W that were not considered adverse. These were no test article-related hormone changes on PND 184 in females and PND 232 in males.

	Erythropoietin concentrations were increased in individual males at ≥ 1 mg/kg Q1W and individual females at 10 mg/kg Q1W at the end of the dosing period, and were considered of uncertain relationship to treatment. There were no test article-related changes in EPO on GD 15 in females or PND 233 in males. There were no changes in femur measurements determined at either necropsy (end of dosing period and end of treatment-free period). Using dual energy X-ray absorptiometry (ex-vivo), minor changes in bone diameter (whole femur and subregions), BMD, and/or BMC were noted at ≥ 1 mg/kg Q1W at the end of the dosing and treatment-free periods. Following weekly dosing for 13 weeks, sotatercept exposure across the dose range increased by 1.97 to 5.40-fold in males and 2.45- to 4.85-fold in females. No ADAs were detected in the TK animals tested on PND 128. Sotatercept concentrations in Main Study animals (Subset 1) on PND 98 were similar to the concentrations present in TK animals at 168 h after dosing on PND 91. With the exception of 4 animals, no ADAs were detected in the main phase (Subsets 1 and 2) animals tested on GD 15, PND 98, and PND 233. At some timepoints, elevated levels of circulating sotatercept may have interfered with the detection of ADAs, leading to false negative results. TDAR and immunophenotyping assessments were performed during the dosing and treatment-free periods in Subset 4 animals. There were no test article-related effects on T-dependent IgM or IgG antibody response when animals were challenged with KLH during the dosing or treatment-free periods. In the immunophenotyping evaluation during the dosing phase, lymphocyte counts were increased in males at ≥ 3 mg/kg Q1W (effect was reflected in the B cell compartment, but not in NK or T cells). In females, a dose-dependent trend of decreased NK cell percentages at ≥ 1 mg/kg Q1W correlated with a reduction in absolute NK cell number at 10 mg/kg Q1W in females. During the treatment-free phase, lymphocyte counts remained increased in 10 mg/kg Q1W males, but NK cell changes in females resolved. These minimal to mild changes (2-3 fold in B cells and < 2 fold in total lymphocytes and NK cells) reflected a slight increase in lymphocyte activation after KLH challenge and are not considered adverse due to the low magnitude of the change and a trend for recovery in most lymphocyte subsets. In conclusion, based on adverse postmortem changes that did not demonstrate reversibility, delays in sexual maturation in males and females, and decreases in male fertility indices, the NOEL and NOAEL for this study were < 1 mg/kg Q1W ($AUC_{0-168h} = 3080 \mu g \cdot h/mL$, < 2-fold the clinical exposure at the MRHD).
6) local tolerability	Local tolerance was assessed as part of the IV and SC repeat-dose studies in rats and monkeys. Sotatercept was well-tolerated in rats and monkeys locally by both routes of administration.
7) other toxicity studies:	

antigenicity (antibody production)	There was no evidence of hypersensitivity or anaphylaxis due to potential immunogenicity induced by sotatercept in the routine repeat-dose toxicity studies. Immunogenicity (the ADA response) to sotatercept was evaluated in the repeat-dose toxicity studies in rats and monkeys, in the developmental and reproductive toxicity studies, and in the juvenile rat toxicity studies. Sotatercept elicited ADA responses after repeat doses, which is typical of many biopharmaceuticals in animals.
immunotoxicity	Activins are known to play a role in the regulation of immune responses based on in vitro and in vivo data from the literature. The response varies between cell types and differs depending on cell maturation, cell activation status, as well as on the spatial and temporal context of the immune response. Activin A has been shown to regulate either pro- or anti-inflammatory responses in macrophages, depending on their prior activation status. In addition, activin A may stimulate antibody production by B cells and may influence the development of regulatory T cells. In contrast, the potential effects of GDF-8, GDF-11, and BMP-10 on immune function are not well described. Although sotatercept can modulate activin levels in the circulation, it does not block residual ligand signaling at target cellular receptors, and it is unlikely to interfere with autocrine and paracrine activin signaling. Although there is literature evidence suggesting potential for altered immune function, there is no definitive evidence that sotatercept affects immune function. One sotatercept monkey study was terminated early due to presence of plasmodium infection in many animals and the early death of 1 animal due to fulminant malaria. Plasmodium was present prior to study start, but increased in incidence and severity over the 9-week dosing period. While it is possible that sotatercept-mediated changes in immune function increased the susceptibility of these animals to infection, it is well-recognized that erythropoiesis-promoting drugs can increase plasmodium infection by increasing the population of potential host cells. It is therefore considered likely that sotatercept-mediated increases in RBC and reticulocytes, and not changes in immune function, increased the susceptibility of the treated animals to plasmodium infection. In the completed sotatercept nonclinical studies, minimal to moderate lymphoid depletion in the thymus occurred in monkeys at dosages ≥ 10 mg/kg Q2W in the 27-week study and in the spleen at dosages ≥ 2.6 mg/kg Q4W in the 9-month study. However, in monkeys and adult rats at all tested doses, there was no evidence of degeneration or necrosis in the thymus or spleen, no adverse findings in other lymphoid tissues, no meaningful changes in circulating white blood cells, and no changes in serum globulin concentrations. Minor changes in the bone marrow myeloid/erythroid ratio in monkeys and juvenile rats were consistent with mild pharmacologically-mediated increases in

	erythroid parameters, and occurred in the absence of adverse changes in circulating white blood cells. Lymphoid changes in juvenile rats were generally limited to minimal to mild decreases in cellularity in the marginal zone of the white pulp and/or minimal to mild increases in cellularity in the red pulp of the spleen. In the pivotal juvenile rat study, there were no test article-related changes in the TDAR assay, and immunophenotyping data did not suggest immune suppression. Lastly, there was no strong signal for hyperplasia and no evidence of tumor formation in any sotatercept nonclinical study. In conclusion, the totality of the nonclinical data indicate that sotatercept does not have toxicologically meaningful immunomodulatory effects.
investigation of mechanisms of action	The mechanism of action was assessed as part of the secondary pharmacodynamics studies. No additional mechanistic studies were conducted.
drug dependence	Sotatercept is a large molecular weight protein that will not cross the blood brain barrier. There was no indication that sotatercept has a pharmacologic profile consistent with drug abuse liability potential. In addition, there were no neurological evaluation findings or clinical signs in the repeat-dose toxicity studies suggestive of psychoactive effects (ie, sedative or stimulant effects). As such, no animal abuse potential studies were conducted, and the potential for abuse liability is considered to be very low.
toxicity of metabolites	Sotatercept is a protein therapeutic consisting entirely of naturally occurring amino acids and typical proteolytic pathways are expected to be the primary route of catabolism. The potential toxicity of sotatercept metabolites was assessed as part of the repeat-dose toxicity studies. No additional metabolite studies were conducted.
toxicity of impurities	No nonclinical studies were conducted with any individual impurities. Impurities in the drug substance were qualified at the specified levels in toxicity studies conducted with the various batches/lots of sotatercept.
other	Phototoxicity As discussed in ICH Guidance S10 (Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals), the guideline “generally does not apply to peptides, proteins, antibody drug conjugates, or oligonucleotides.” Therefore, the evaluation of a protein drug like sotatercept for phototoxicity is deemed not warranted. Based on this rationale, no preclinical phototoxicity testing was performed for sotatercept and none is planned. RAP-011: A 3-Month Intraperitoneal Toxicity Study in Mice with a 1-Month Recovery This GLP study was conducted as an investigational toxicity study in CD-1 mice using RAP-011, which is a fusion protein similar to sotatercept. RAP-011 contains a murine Fc fragment (IgG2a) instead of a human Fc fragment (IgG1). The goal of this

investigational study was to identify target organ toxicity following repeated IP dosing in rodents, in which an antibody response to the test article would not be expected to develop. RAP-011 was administered IP twice weekly (TW) to mice. RAP-011 dissolved in vehicle was administered at doses of 0 (vehicle), 10, 30, or 50 mg/kg TW for 3 months. Each dose group included 20 animals/sex/group. The first 10 animals/sex/group were designated for necropsy on Study Day 92, and 10 animals/sex/group were designated for necropsy on Study Day 120 (following a 1-month treatment-free period).

Animals were assessed for mortality and changes in clinical signs, body weight, body weight change, food consumption, hematology and clinical chemistry, and postmortem parameters. Test article-related mortality occurred primarily at doses ≥ 30 mg/kg TW. Unscheduled deaths included a total of 34 treated animals that were sacrificed in a moribund condition or found dead (2/40, 15/40, and 17/40 animals dosed at 10, 30, and 50 mg/kg TW, respectively, beginning around SD 60). Due to continuing morbidity, surviving 50 mg/kg TW females were terminated on Study Day 74, and all surviving 50 mg/kg TW males (including those designated for the treatment-free period) were terminated on Study Day 92 (end of the treatment period). At necropsies, red fluid was observed in the thoracic cavity.

In unscheduled death animals and surviving animals across the dose range, clinical signs included rapid respiration and rough hair coat.

Test article-related small transient increases and decreases in mean body weight/body weight change were observed in females and males across the dose range, with increases in these parameters sometimes correlating with increases in food consumption.

Red blood cell parameters (RBC, RDW, HGB and HCT, and reticulocyte counts) were elevated in all RAP-011-treated groups. There was a slight, reversible dose-related increase in liver enzymes (AST and ALT) along with increases in sodium and triglycerides that had all resolved by Study Day 120 (end of treatment-free period).

At scheduled necropsy on Study Day 92, red fluid in the thoracic cavity, suggestive of hemothorax, was frequently observed across the dose range. This finding occurred infrequently in animals necropsied on Study Day 120.

Mean heart weights and kidney weights were decreased in females and males at the end of the dosing (Study Day 92) and treatment-free (Study Day 120) periods.

Histopathological findings were similar across dose groups and were present in the brain, kidney, spleen, and thymus, and to a lesser extent in the heart and lung. These included minimal multifocal mineralization of the choroid plexus; minimal to mild multifocal bilateral degeneration/necrosis of the tubule lining cells in the renal cortex; minimal multifocal alveolar

histiocytosis; and minimal to moderate degenerative/necrosis of ventricular myocardium. In addition, mild to moderate increased hematopoiesis was observed in the spleen. The lymphoid depletion noted in lymphoid organs (spleen, thymus, and lymph nodes) was likely the result of the debilitated condition of the mice.

In summary, RAP-011 administered intraperitoneally (IP) at doses of 10, 30, or 50 mg/kg TW resulted in excessive toxicity/mortality at doses $\geq$ 30 mg/kg TW. Dosages $\geq$ 10 mg/kg TW resulted in pharmacologically-mediated increases in erythroid parameters and splenic hematopoiesis as well as decreases in heart and kidney weights and histopathological findings in the choroid plexus of the brain. At overtly toxic doses, RAP-011 also caused lesions within the tubules within the renal cortex, alveolar histiocytosis, and degeneration/necrosis of ventricular myocardium.

Sotatercept, ACE-536, RAP-011, and RAP-536: A Renal Toxicity Study of Sotatercept, ACE-536, RAP-011, and RAP-536 in the 5/6 Nephrectomy or Unilateral Ureter Ligation Models in Female Sprague-Dawley Rats

The objective of this study was to assess the potential effects of sotatercept and its murine analog RAP-011, and ACE-536 and its murine analog RAP-536, in two rodent models of renal compromise: 5/6 nephrectomy and unilateral ureteral ligation (UUL). Only results from sotatercept and RAP-011 are summarized below. The 5/6 nephrectomy and UUL models of renal compromise were used in this study. Each model was tested in one of the two arms of the study. Each arm was composed of seven treatment groups with 6 surgically-altered and 3 sham-operated animals treated SC Q1W for 13 weeks. Sotatercept was administered SC at doses of 1 or 10 mg/kg Q1W to animals in the 5/6 nephrectomy study arm (Groups 2 and 3) and the UUL study arm (Groups 9 and 10). RAP-011 was administered SC at a dose of 10 mg/kg Q1W to animals in the 5/6 nephrectomy study arm (Group 6) and the UUL study arm (Group 13). Groups 1 (5/6 nephrectomy study arm) and 8 (UUL study arm) received the vehicle control. The 5/6 nephrectomy surgery occurred during Study Week 3 and the UUL surgery occurred during Study Week 11.

Study parameters evaluated included mortality, clinical observations, body weights, food consumption, hematology, serum creatinine, urea nitrogen, urine parameters (creatinine, volume, and the biomarkers albumin, T cell Ig mucin, also known as KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1) (TIM-1), Lipocalin-2, and osteopontin), and histomorphologic examination of the kidney. Kidney expression data for 12 target genes and 8 miRNA transcripts were examined. Sotatercept drug concentrations were measured. ADA were determined for sotatercept and RAP-011-treated animals.

There were no test article-related mortalities, and no body weight, food consumption, serum creatinine, urea nitrogen, or urine creatinine and volume parameters changes. There were no test article-related changes in kidney gene/ micro ribonucleic acid (miRNA) expression.

Test article-related limb swelling occurred in 1 sotatercept (1 mg/kg Q1W)-treated animal, and pharmacologically-mediated slight increases in red blood cell mass (RBC, HGB, and HCT) occurred at all doses of sotatercept and RAP-011 in 5/6 nephrectomized rats and at 10 mg/kg Q1W sotatercept and RAP-011 in UUL rats.

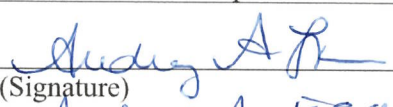
Test article-related increases in the kidney urinary biomarkers albumin, TIM-1, lipocalin-2, and osteopontin occurred in most sotatercept and RAP-011-treated groups of 5/6 nephrectomized animals. Lipocalin-2 was minimally increased in sotatercept- and RAP-011-treated UUL animals.

When compared with nephrectomized animals treated with the vehicle, or the respective sham-operated ACE and RAP treatment groups, average severity grades for a comparable spectrum of glomerular changes were notably increased in nephrectomized animals treated with sotatercept or RAP-011. Additional findings in sotatercept and RAP-011 treated groups included changes in the glomerulus (hyaline accumulation, epithelial crescent formation, increased thickness of Bowman's capsule, dilation of Bowman's space, and/or glomerular atrophy), an increased incidence and/or severity of tubulointerstitial lesions (tubular dilation and/or basophilia, interstitial fibroplasia/fibrosis, and/or mononuclear inflammatory cell infiltrates), and increased glomerular and tubulointerstitial immunostaining for pSmad2 and α SMA.

In the UUL 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, sotatercept, and RAP-011 treatment groups.

Fifty eight percent (58 %) of sotatercept treated animals and 11 % of the RAP-011 treated animals were identified as ADA positive on Study Day 92. In ADA negative animals, serum drug concentrations measured after the last dose were 2 to 10-fold higher than concentrations measured after the first dose, indicating accumulation of drug. In contrast, drug concentrations decreased over the course of the study in most ADA positive animals.

In conclusion, the SC administration of sotatercept and RAP-011 Q1W to 5/6 nephrectomized animals caused notable exacerbation of glomerular and tubulointerstitial lesions, increased pSmad2 and α SMA immunostaining, and increased urinary albumin, TIM-1, lipocalin-2, and/or osteopontin levels when compared to vehicle-treated nephrectomized or respective sham-operated sotatercept and RAP-011 treatment groups. Due

	to the advanced state of the changes in renal morphology associated with unilateral ureteral obstruction, the potential histomorphologic effects of treatment with sotatercept and RAP-011 could not be determined in obstructed kidneys.
5. Conclusions on non-clinical study	In conclusion, the TGF-β superfamily of ligands bound by sotatercept exhibit a diverse range of influences on growth, development, and homeostasis in numerous tissues and organ systems. The potential for adverse effects was broadly assessed in the nonclinical toxicology studies conducted with sotatercept. Kidney injury observed in rats and monkeys has not translated to humans in clinical trials performed to date. Histomorphologic changes noted in the monkey choroid plexus were not associated with other structural brain changes or behavioral alterations, and were not considered adverse. In rats, effects on heart weight were nonadverse and reversible, and changes in the efferent ducts/testes and adrenal gland are unlikely to translate to humans based on differences in organ structure (see discussion in the summary of the male fertility assessment of sotatercept) and maturation patterns, respectively. Adrenal remodeling is sensitive to alterations in activin signaling. Although rats are susceptible to adrenal gland changes up until adulthood, human adrenal remodeling is complete within 3 to 6 weeks after birth. Sotatercept had adverse effects on fertility in male (reversible) and female rats, caused pre- and postimplantation loss, has been shown to cross the placenta, and caused decreases in pup weights and ossification-related changes that were mostly reversible in the rat and rabbit embryo-fetal development (EFD) and rat PPND studies (including in rat pups exposed to sotatercept exclusively via milk). In juvenile rats, sotatercept decreased body weights and delayed sexual maturation. Other toxicities were similar in juvenile and adult rats, with juvenile animals generally being more sensitive than adults. Lastly, erythroid changes observed in rats and monkeys were also observed in clinical trials, are reversible, and nonadverse. The nonclinical profile supports the safe use of sotatercept for the treatment of PAH, WHO Group 1.
Applicant (owner of registration certificate)	 (Signature) Audrey A. Egan (Full name)

Додаток 29
до Порядку проведення експертизи
реєстраційних матеріалів на лікарські
засоби, що подаються на державну
реєстрацію (перереєстрацію), а також
експертизи матеріалів про внесення
змін до реєстраційних матеріалів
протягом дії реєстраційного
посвідчення
(пункт 10 розділу IV)

ЗВІТ про доклінічні дослідження

1. Назва лікарського засобу (за наявності - номер реєстраційного посвідчення):	Вінревейр
1) тип лікарського засобу, за яким проводилася або планується реєстрація	Лікарський засіб за повним досьє (автономне досьє). Нова діюча речовина.
2) проведені дослідження	☒ Так ☐ Ні якщо ні, обґрунтувати
2. Фармакологія:	
1) первинна фармакодинаміка	Первинна фармакодинаміка <i>In Vitro</i> Механізм дії Фонові біологічні аспекти: сигналізація трансформуючого фактора росту бета при легеневій артеріальній гіпертензії. Суперсімейство лігандів трансформуючого фактору росту-β (TGF-β) бере участь у диференціації та проліферації різних типів клітин, метаболізмі клітин, рухливості, інвазії та смерті, а також у продукції позаклітинного матриксу. На даний момент ідентифіковано тридцять три ліганди, включаючи ізоформи TGF-β, активіни, фактори росту та диференціації (GDF), інгібіни, вузлові, антимюллерові гормони (AMH) та кісткові морфогенетичні білки (BMP). Кожному члену сімейства лігандів TGF-β потрібна обробка (розщеплення), щоб стати активним. Після активації вони пов'язують, збирають та стабілізують специфічні комбінації гетеротетрамерних комплексів серин/треонінових та тирозинкіназних рецепторів типу I та типу II. В цілому, зв'язування лігандів з їх рецепторами викликає фосфорилювання рецептора типу I, опосередковане рецептором типу II, що призводить до активації його кіназної функції. Це фосфорилювання викликає внутрішньоклітинні сигнали, які поділяються на канонічні та неканонічні явища. Канонічний шлях активує трансформаційні фактори материнських проти декапентаплегічних гомологів (регульованих рецептором, R-Smads), у той час як неканонічний шлях включає фосфорилювання кількох кіназ,

таких як p38 мітоген-активована протеїнкіназа (МАРК), регульована позаклітинним сигналом протеїнкіназа 1 і 2 (Erk1/2), c-Jun N-термінальна кіназа (JNK), фосфоінозитид-3-кіназа (PI3K), гомологічна Rho (Rho) GTPаза, що сприяє транскрипції.

В ендотелії, як тільки рецептори типу I фосфорилуються їх партнерами типу II, вони, зокрема, опосередковують фосфорилування Smad 2/3 (для типу I (активін-подібний) рецептор (ALK4/5)) взаємодії з активінами, GDF та TGF- β) та Smad 1/5/8 (для типу I (ALK1/2/3) взаємодії з BMP). Потім вони збираються в комплекс із загальним медіатором Smad (Co-Smad4), який полегшує інтерналізацію в ядро та зв'язування з дезоксирибонуклеїновою кислотою (ДНК). Ендотеліальні клітини одночасно інтегрують як проліферативні (TGF- β /активіни-Smad2/3), так і антипроліферативні (BMP-Smad1/5/8) сигнальні шляхи, які також чутливі до біомеханічних сил, що діють на судинну систему. Члени суперсімейства лігандів TGF- β , які передають сигнали через Smad2/3, були пов'язані з гіперпроліферацією судинних клітин, що призводить до артеріального ремоделювання легених артерій та камер серця. Наприклад, було показано, що TGF- β 1 пригнічує апоптоз гладком'язових клітин легених артерій за допомогою активації шляху PI3K/АКТ і сприяє проліферації гладком'язових клітин легенової артерії. Пряма участь TGF- β 1 у звуженні легених артерій була показана у моделях монокроталіну та Sugen-гіпоксії легенової артеріальної гіпертензії (ЛАГ) за допомогою використання лігандної пастки TGF- β (рекомбінантний білок злиття позаклітинного домену TGF β RII-Fc, селективний до TGF- β 1 та TGF- β 3). У цій моделі TGF β RII-Fc блокував канонічну передачу сигналів Smad 2/3, пригнічував ремоделювання судин і, зрештою, зменшував гіпертрофію правого шлуночка. Подібні результати були отримані з використанням антитіла до TGF- β , а також антитіла до рецептора TGF- β . Також повідомлялося про порушення регуляції сигналізації TGF- β у серцево-судинних проявах синдромів Марфана та Лойеса-Дітца.

Активін А і GDF-11, два інших представника сімейства TGF- β , які запускають передачу сигналів Smad2/3, також пов'язані з гіперпроліферацією. Підвищена експресія активіну А і GDF11 при ураженнях легенів разом із підвищеними циркулюючими рівнями активіну А було показано у пацієнтів з легеновою гіпертензією (ЛГ) і на доклінічних моделях ЛАГ. У легенях активін А локалізується в першу чергу в бронхіальних епітеліальних клітинах і макрофагах і, як повідомляється, сприяє проліферації гладком'язових клітин і експресії ендотеліну-1 (ЕТ-1), ключового модулятора ЛАГ. У той час як активін А стимулює проліферацію гладком'язових клітин, гладком'язові клітини

пацієнтів з ЛАГ також демонструють посилений синтез активіну А, забезпечуючи локальну пряму петлю проліферації. Схоже, що участь GDF-11 у ЛАГ обмежена компартментом ендотеліальних клітин, і було показано, що його селективне зниження регуляції є захисним у моделі ЛАГ.

Генетичні та функціональні дослідження демонструють, що ослаблена передача сигналів BMP тісно пов'язана з розвитком ЛАГ. Було показано, що порушення регуляції передачі сигналів рецептора кісткового морфогенетичного білка 2 (BMPR2) в ендотеліальних клітинах легеневих судин, ключових регуляторах структури та функції легеневих судин, запускає диференціацію та проліферацію судинних гладком'язових клітин (VSMC), що призводить до ремоделювання легеневої судинної системи, що є основною ознакою ЛАГ. Зв'язок між мутаціями втрати функції в BMPR2 і розвитком ЛАГ є найбільш переконливим доказом зв'язку цього сигнального шляху з хворобою. Крім того, знижені рівні білка BMPR2 були виявлені як при сімейній, так і при ідіопатичній ЛАГ, навіть за відсутності мутації BMPR2. Переконливі докази свідчать про те, що дисбаланс між активіном/GDF і сигнальним шляхом BMP є ключовим фактором, що сприяє ЛАГ.

Механізм дії сотатерцепту

Сотатерцепт є інгібітором сигналу активіну. Механізм його дії полягає у відновленні балансу між протилежними внутрішньоклітинними сигнальними шляхами Smad2/3 та Smad1/5/8. Сотатерцепт функціонує як розчинна форма рецептора активіну типу ІІА (ActRIIA) щоб захоплювати лігандів суперсімейства TGF- β , які зазвичай зв'язуються з ActRIIA, таких як активін А і В, GDF-11, GDF-8 і BMP-10, і запобігати їх зв'язуванню з ActRIIA та індукції сигнального шляху Smad2/3. У стані захворювання ЛАГ шлях Smad1/5/8 в ендотеліальних клітинах легеневих судин серйозно порушений через втрату функціональних мутацій у рецепторі BMPR2 або факторами (наприклад, спричиненими активацією шляху ActRIIA/ALK(s), які впливають на трансдукцію сигналу Smad 1/5/8, що призводить до неконтрольованої проліферації судинних гладком'язових клітин. Через інгібування сигнального шляху Smad2/3 сотатерцепт відновлює баланс протилежних шляхів Smad, що призводить до відновлення гомеостазу щодо проліферації гладком'язових клітин.

Ідентичність амінокислотної послідовності у різних видів
Амінокислотна послідовність позаклітинного домену (ECD) та структура ActRIIA є висококонсервативними для різних видів, включаючи щура, кроля, яванську макаку та людину, та є ідентичними між сотатерцептом та мишачим сурогатом для сотатерцепту, сконструйованим шляхом заміни людського IgG Fc сотатерцепту на мишачий IgG Fc (RAP-

011). Вирівнювання амінокислотної послідовності показує 100% гомологію між видами гризунів, яванських макак та людини для активіну А та GDF-11 та 97–98% гомологію для активіну В та BMP10.

Первинна фармакодинаміка *In Vivo*

Мишачий сурогат RAP-011

Були проведені доклінічні фармакологічні дослідження *in vivo* з мишачим сурогатом сотатерцепту RAP-011. Молекулу RAP-011 було сконструйовано шляхом заміни області кристалізованого фрагменту (Fc) людського імуноглобуліну G підкласу 1 (IgG1) сотатерцепту на мишачий імуноглобулін G підкласу 2a (IgG2a) Fc. Мишачий сурогат RAP-011 продемонстрував подібну афінність зв'язування (а також профіль селективності) до лігандів суперсімейства TGF- β , таких як сотатерцепт.

Активність RAP-011 у моделях легеневої артеріальної гіпертензії шурів з монокроталіном (MCT) і Sugen-гіпоксією

RAP-011 був протестований на двох добре відомих моделях ЛАГ на гризунах (монокроталін і Sugen-гіпоксія). Обидві моделі відтворюють деякі ключові патології, пов'язані з ЛАГ, включаючи проліферацію ендотеліальних і гладком'язових клітин, мускуляризацію легеневої артеріальної судинної системи, розвиток легеневої гіпертензії та гіпертрофію правого шлуночка.

У моделі монокроталіну (MCT) легенева гіпертензія була індукована у самців шурів лінії Вістар протягом 4 тижнів після одноразового підшкірного введення монокроталіну в дозі 40 мг/кг. Тварини отримували лікування носієм (10 мМ трис-буферизований фізіологічний розчин (TBS), підшкірно), RAP-011 (15 мг/кг, внутрішньочеревно двічі на тиждень) або вазодилататором силденафілу (30 мг/кг, перорально, двічі на день) протягом 4 тижнів, починаючи з 1 дня після введення монокроталіну (MCT). У шурів, які отримували носій MCT, спостерігалось значне підвищення середнього легеневого артеріального тиску (mPAP) і гіпертрофія правого шлуночка (ПШ). Лікування RAP-011 протягом 4 тижнів поспіль нормалізувало mPAP і покращило гіпертрофію ПШ. Силденафіл продемонстрував помірний вплив на mPAP і не покращив гіпертрофію ПШ. Лікування RAP-011 значно вплинуло на ремоделювання легневих судин.

У подібному дослідженні на моделі ЛАГ, індукованої MCT, у шурів, які отримували носій, спостерігалось значне збільшення CD11b⁺ макрофагів ($p < 0,05$) у легенях, тоді як лікування RAP-011 значно зменшило збільшення CD11b⁺ макрофагів ($p < 0,05$). RAP-011 пригнічував легеневе запалення та запобігав інфільтрації макрофагів у цій моделі ЛАГ.

У моделі Sugen-гіпоксії легенева гіпертензія була встановлена шляхом одноразового підшкірного введення антагоніста рецептора фактора росту судинного ендотелію Sugen 5416 (SU5416) у дозі 200 мг/кг дорослим самцям щурів лінії Спрег-Доулі з негайним початком впливу гіпоксії (10 % кисню) протягом 4 тижнів. Тварини отримували лікування носієм (10 мМ TBS, підшкірно), RAP-011 (10 мг/кг, внутрішньочеревно двічі на тиждень) або силденафілом (30 мг/кг перорально двічі на день) протягом 4 тижнів, починаючи з 1 дня після введення антагоніста рецептора фактора росту судинного ендотелію Sugen 5416 (SU5416).

У щурів з Sugen-гіпоксією, які отримували лікування носієм, спостерігалось значне підвищення середнього легеневого артеріального тиску (mPAP) та розвиток гіпертрофії ПШ. Лікування RAP-011 протягом 4 тижнів поспіль нормалізувало mPAP і покращило гіпертрофію ПШ. Силденафіл мав помірний вплив на mPAP і не покращив гіпертрофію ПШ.

Активність RAP-011 у моделі Sugen-гіпоксії-нормоксії (SuHxNx) легеневої артеріальної гіпертензії щурів

RAP-011 оцінювали на моделі щурів Sugen-гіпоксії-нормоксії (SuHxNx), коли вже було встановлено моделювання легеневої гіпертензії та ПШ. У моделі SuHxNx легенева гіпертензія було встановлено під час одноразового підшкірного введення SU5416 (20 мг/кг) дорослим самцям щурів лінії Спрег-Доулі з негайним початком впливу гіпоксії (10 % кисню) протягом 3 тижнів з наступною нормоксією (21 % кисню) протягом наступних 6 тижнів. У щурів SuHxNx на початку терапевтичного лікування (5-й тиждень) спостерігалася легенева гіпертензія та гіпертрофія ПШ, які не зменшувалися до 9-го тижня. Тварини отримували лікування носієм (забуферений фосфатом фізіологічний розчин (ФСБ); підшкірно), RAP-011 (2,5 мг/кг, підшкірно двічі на тиждень), силденафілом (30 мг/кг перорально двічі на день) або комбіновану терапію між 5 і 9 тижнями. У щурів SuHxNx, які отримували лікування носієм, спостерігалось значне підвищення систолічного тиску в правому шлуночку (RVSP) і індексу загального легеневого судинного опору (TPRI). Лікування RAP-011, починаючи з 5-го тижня, відновило RVSP і помітно знизило TPRI до 9-го тижня в порівнянні з щурами SuHxNx, які отримували лікування носієм. Монотерапія RAP-011 і комбінована терапія з вазодилататором силденафілом призвела до значно більшого покращення, ніж застосування силденафілу окремо.

У цій моделі ремоделювання легених судин було вираженим у щурів SuHxNx до 5-го тижня з ураженнями, що призводили до різного ступеня судинної оклюзії. На 9-му тижні спостерігалася значно більша поширеність найважчого ступеня судинної оклюзії порівняно з

попереднім часом, що відповідає прогресуванню захворювання протягом цього інтервалу. Лікування RAP-011, починаючи з 5-го тижня, майже повністю відновило судинне ремоделювання до 9-го тижня порівняно з щурами SuHxNx, які не отримували лікування. Лікування RAP-011 ефективніше відновлювало оклюзію судин, ніж силденафіл, і RAP-011 у поєднанні з силденафілом призвело до значно більшого покращення судинної оклюзії, ніж силденафіл окремо.

У моделі також спостерігалися ремоделювання та дисфункція ПШ. Товщина стінки правого шлуночка (RVWT) і гіпертрофія ПШ були значно збільшені у щурів SuHxNx, які не отримували лікування на початку терапевтичного лікування (тиждень 5) і продовжувалися до тижня 9.

Лікування RAP-011, починаючи з 5-го тижня, значно покращило RVWT і гіпертрофію ПШ до 9-го тижня порівняно з щурами SuHxNx, які отримували лікування носієм. Порівняно з нормальною групою, щури SuHxNx продемонстрували порушення функції ПШ зі значним зменшенням систолічного зміщення трикуспідального кільця (TAPSE) і зміни фракційної площі ПШ на початку терапевтичного лікування (тиждень 5), що продовжувалося до 9 тижня. Лікування RAP-011, починаючи з 5-го тижня, покращило ці параметри до 9-го тижня порівняно з щурами SuHxNx, які отримували лікування носієм. Монотерапія RAP-011 і комбінована терапія із вазодилататором силденафілом призвели до значно більшого покращення, ніж силденафіл окремо.

Щоб оцінити, чи зберігаються серцево-легеневі переваги лікування RAP-011 у моделі SuHxNx ЛАГ після припинення лікування, лікування RAP-011 було скасовано на 9-му тижні і тварин спостерігали протягом 4 додаткових тижнів. Лікування RAP-011, починаючи з 5-го тижня, призвело до значного покращення RVSP, TPRI, TAPSE, часу прискорення легеневої артерії (РААТ) і гіпертрофії ПШ до 9-го тижня, які зберігалися до 13-го тижня, через 4 тижні після припинення введення RAP-011, порівняно з щурами SuHxNx, які не отримували лікування.

Активність RAP-011 у моделі легеневої артеріальної гіпертензії у мишей з недостатністю рецептора кісткових морфогенетичних білків типу 2 ($Bmpr2^{+/R899X}$)

RAP-011 також оцінювали на моделі спадкової ЛАГ, що виникає внаслідок гаплонедостатності $Bmpr2$ (миші $Bmpr2^{+/R899X}$). У цій моделі легенева гіпертензію індукували шляхом піддання мишей-самців $Bmpr2^{+/R899X}$ гіпоксичним (10% кисню) умовам протягом 5 тижнів.

Одночасно мишей лікували носієм (ФСБ, підшкірно) або RAP-011 (10 мг/кг, підшкірно двічі на тиждень) протягом 5 тижнів. У мишей, які отримували носій, спостерігалось значне підвищення RVSP і гіпертрофії ПШ. Лікування RAP-

	011 протягом 5 тижнів поспіль нормалізувало RVSP і гіпертрофію ПШ. У порівнянні з мишами $Bmpr2^{+/R899X}$ в нормоксичних контрольних умовах, вплив гіпоксії на мишей $Bmpr2^{+/R899X}$ значно знижував TAPSE і РААТ, що вказує на дисфункцію ПШ. RAP-011 істотно запобігав зниженню TAPSE і РААТ. Активність RAP-011 у моделі бандажування легеневої артерії (БЛА) у мишей при недостатності правого шлуночка Кардіопротекторні ефекти RAP-011 оцінювали на моделі недостатності правого шлуночка у мишей, спричиненої перевантаженням тиском. У цій моделі перевантаження правого шлуночка тиском через бандажування легеневої артерії (БЛА) викликає ремоделювання та дисфункцію ПШ. Тварини отримували лікування носієм (ФСБ, підшкірно) або RAP-011 (10 мг/кг, підшкірно двічі на тиждень) протягом 3 тижнів, починаючи з 1 дня після операції. У відповідь на хірургічне втручання миші з БЛА, які отримували ФСБ, продемонстрували значне підвищення тиску в ПШ на 21-й день порівняно з групою, якій проводили фіктивну операцію. Лікування RAP-011 суттєво знизило тиск у ПШ порівняно з мишами, які отримували ФСБ. Миші з БЛА показали значне зниження значень TAPSE у порівнянні з групою фіктивної операції. Лікування RAP-011 значно збільшило TAPSE до 21 дня порівняно з мишами з БЛА, які отримували ФСБ. У цій моделі також спостерігалось ремоделювання ПШ. RVWT і гіпертрофія ПШ були значно збільшені у мишей з БЛА, які отримували ФСБ. Лікування RAP-011 значно покращило ці параметри порівняно з мишами з БЛА, які отримували ФСБ. Миші з БЛА, які отримували ФСБ, також продемонстрували значне збільшення вмісту колагену в правому шлуночку порівняно з групою фіктивної операції. Збільшення вмісту колагену пов'язане з ремоделюванням і дисфункцією ПШ. Лікування RAP-011 також значно знизило вміст колагену в ПШ у мишей з БЛА порівняно з групою, що отримувала ФСБ.
2) вторинна фармакодинаміка	Доклінічні фармакологічні дослідження з використанням RAP-011 були проведені для оцінки механізмів, пов'язаних з гематологічними ефектами, оскільки відомо, що активін, раніше описаний як фактор еритроїдної диференціації, відіграє роль у регуляції кінцевої диференціації еритроцитів, що розвиваються. Після введення RAP-011 мишам C57BL/6 активність RAP-011, подібна до стимулятора еритроцитів, призвела до значного збільшення кількості еритроцитів (RBC), гемоглобіну (HGB) і гематокриту (HCT). Також спостерігалось значне підвищення білка еритропоєтину.

	Жодних інших спеціальних досліджень з оцінки вторинної фармакодинаміки сотатерцепту не проводилося, оскільки всі ключові елементи фармакодинаміки, описані в настанові S6 Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських засобів для медичного використання (ICH) біотехнологічних препаратів, включаючи аналізи <i>in vitro</i> для оцінки біологічної активності та специфічності, та дослідження <i>in vivo</i> для оцінки ефективності, були включені до розділу первинної фармакодинаміки.
3) фармакологія безпеки	Відповідно до ICH S6(R1) кінцеві точки фармакологічної безпеки (неврологічні обстеження та температура тіла, частота дихання, електрокардіограма (ЕКГ) та вимірювання артеріального тиску) були включені до 9-місячного дослідження токсичності повторних доз належної лабораторної практики (GLP) у макак. Жодних змін, пов'язаних із сотатерцептом, у будь-яких кінцевих точках фармакологічної безпеки <i>in vivo</i> не спостерігалось. Аналіз hERG <i>in vitro</i> був єдиним незалежним дослідженням фармакологічної безпеки, проведеним із сотатерцептом. Аналіз hERG <i>in vitro</i> оцінював IK50 для інгібуючого впливу сотатерцепту на калієві канали, що пов'язані згеном специфічних калієвих каналів серця людини (hERG) на рівні понад 1000 мкг/мл. Сотатерцепт: вплив сотатерцепту на клоновані калієві канали hERG, що експресуються в ембріональних клітинах нирок людини Сотатерцепт інгібував струм hERG на (середнє $\pm$ SEM; n = 3) $7,2 \pm 0,7\%$ при 300 мкг/мл, $28,6 \pm 0,7\%$ при 600 мкг/мл і $33,8 \pm 1,7\%$ при 1000 мкг/мл порівняно з $2,4 \pm 0,8\%$ в контрольній групі. Інгібування hERG при всіх концентраціях було статистично значущим ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольними значеннями носія. IK50 для інгібуючої дії сотатерцепту на струм калію hERG було оцінено як більше 1000 мкг/мл. Найвища досліджувана концентрація сотатерцепту при 1000 мкг/мл становить приблизно 100-кратний запас порівняно з клінічно спостережуваною максимальною концентрацією ($C_{\max} = 9,67$ мкг/мл) при максимальній рекомендованій дозі для людини (MRHD).
4) фармакодинамічні взаємодії	Доклінічні дослідження фармакодинамічної взаємодії лікарських засобів із сотатерцептом не проводились. Відповідно до меморандуму міжнародного консорціуму щодо взаємодій лікарських засобів між терапевтичними білками та низькомолекулярними препаратами, доклінічні дослідження <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> не вважаються прогностичними для фармакодинамічних взаємодій лікарських засобів для людини. Потенційну взаємодію з іншими лікарськими засобами можна вивчити лише у клінічних дослідженнях.
3. Фармакокінетика:	

1) аналітичні методики та звіти щодо їх валідації	Концентрації сотатерцепту у зразках плазми або сироватки крові щурів лінії Спрег-Доулі, новозеландських білих кролів та яванських макак визначалися або за допомогою сендвіч-імуноферментного аналізу (ELISA), або за допомогою конкурентного аналізу ELISA під час розробки програми. Методи були валідовані в сироватці щурів спочатку з діапазоном кількісного визначення від 0,98 до 31,25 нг/мл, а потім згодом з вищим діапазоном кількісного визначення від 40,0 до 2000 нг/мл. Метод був валідований у сироватці кролів із діапазоном кількісного визначення від 40,0 до 2000 нг/мл. Методи були валідовані в плазмі макак з діапазоном кількісного визначення від 86 до 2333 нг/мл, а потім у сироватці макак з діапазоном кількісного визначення від 7,81 до 250 нг/мл. Точність визначення сотатерцепту в аналізі сироватки щурів у нижньому діапазоні становила від 96,0 до 103,0% від номінальних значень калібрувальної кривої, а прецизійність склала від 3,3 до 10,8% при всіх калібрувальних концентраціях. Міжденна точність та прецизійність із зразків контролю якості (КЯ) варіювались від 95,0 до 101,0 % та від 10,3 до 22,6 % відповідно. Точність визначення сотатерцепту методом для сироватки щурів у високому діапазоні становила 96,6-103,2% від номінальних значень калібрувальної кривої, а прецизійність склала 2,9-8,4 % при всіх концентраціях калібрування. Міжденна точність та прецизійність зразків контролю якості становлять від 84,4 до 91,6 % та від 6,7 до 19,3 % відповідно. Точність сотатерцепту в аналізі сироватки крові кроля становила 98,4-103,5 % від номінальних значень калібрувальної кривої, а прецизійність склала 1,3-5,6 % при всіх концентраціях калібрування. Міжденна точність і прецизійність зразків КЯ коливались від 99,8 до 114,3 % і від 6,6 до 16,0 % відповідно. Точність визначення сотатерцепту з аналізу плазми крові макак становила від 91,0 до 136,0 % від номінальних значень калібрувальної кривої, а прецизійність становила від 3,0 до 29,0 % при всіх калібрувальних концентраціях. Міжденна точність і прецизійність зразків КЯ коливаються від 83,0 до 91,8 % і від 6,0 до 15,0 % відповідно. Точність визначення сотатерцепту в аналізі сироватки макаки становила від 98,2 до 113,1 % від номінальних значень калібрувальної кривої, а прецизійність становила від 1,2 до 29,8 % для всіх калібрувальних концентрацій. Міжденна точність і прецизійність зразків КЯ коливаються від 86,1 до 92,8 % і від 8,1 до 15,6 % відповідно. Для виявлення утворення антитіл до лікарського засобу (АТП) у щурів лінії Спрег-Доулі, новозеландських кролів та яванських макак були валідовані зв'язувальні імуноаналізи за допомогою ELISA або методи електрогенерованої хемілюмінесценції (ЕХЛ) для сироватки щурів, кролів та макак. Початковий метод був валідований на сироватці
--	--

	щурів із значеннями позитивного контролю (ПК) у діапазоні від 25 до 1600 нг/мл. Прецизійність між аналізами цих зразків ПК становила від 4,9 до 20,0 %. Чутливість аналізу була визначена для виявлення 500 нг/мл АТП. Метод був валідований у сироватці крові щурів зі значеннями позитивного контролю в діапазоні від 100 до 5000 нг/мл. Прецизійність між аналізами цих зразків ПК становила від 5,0 до 6,6 %. Чутливість аналізу була визначена для виявлення 9,3 нг/мл антитіл до сотатерцепту в сироватці крові щурів. Подальшу часткову валідацію проводили у сироватці крові щурів зі значеннями позитивного контролю в діапазоні від 100 до 5000 нг/мл. Прецизійність між аналізами цих зразків ПК становила від 8,9 до 11,9 %. Чутливість аналізу залишалася 9,3 нг/мл антитіл до сотатерцепту в сироватці крові щурів. Метод було валідовано в сироватці крові кроля зі значеннями позитивного контролю в діапазоні від 100 до 5000 нг/мл. Прецизійність між аналізами цих зразків ПК становила від 6,0 до 7,9 %. Чутливість аналізу була визначена для виявлення 24,5 нг/мл АТП в сироватці крові кроля. Метод було валідовано в сироватці крові макак із значеннями позитивного контролю в діапазоні від 25 до 1600 нг/мл. Прецизійність між аналізами цих зразків ПК становила від 5,7 до 24,3 %. Чутливість аналізу була визначена для виявлення 500 нг/мл АТП в сироватці крові макак. Подальший метод був валідований у сироватці макак із значеннями позитивного контролю в діапазоні від 100 до 5000 нг/мл. Прецизійність між аналізами цих зразків ПК становила від 6,8 до 10,9 %. Чутливість аналізу була визначена для виявлення 17,1 нг/мл антитіл до сотатерцепту в сироватці крові макак. Ці валідації методик відповідали чинним на той час рекомендаціям (Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США (FDA) для промисловості: валідація біоаналітичних методик (FDA США, 2001 та 2018), та проекту рекомендацій FDA США для промисловості: розробка аналізів для тестування імуногенності терапевтичних білків (FDA США, 2009 та 2019).
2) всмоктування	Параметри ФК сотатерцепту були охарактеризовані у щурів лінії Спрег-Доулі, вагітних новозеландських кролиць та яванських макак після внутрішньовенного та/або підшкірного введення. Аналіз ФК проводився з використанням програмного забезпечення WinNonlin (версії 5.0.1 або вище) з абсорбцією першого ладу та елімінацією першого ладу або некомпартментним аналізом (NCA). Внутрішньовенний спосіб введення ФК сотатерцепту оцінювали після одноразового внутрішньовенного введення щурам і макакам. Загалом не спостерігалось суттєвих статевих відмінностей у ФК

	сотатерцепту при внутрішньовенному введення досліджуваним видам тварин. Фармакокінетичні дослідження одноразової внутрішньовенної дози на щурах Після одноразового внутрішньовенного введення дози щурам сотатерцепт продемонстрував лінійну ФК із середнім періодом напіввиведення ($t_{1/2}$) у діапазоні від 140,8 до 203,9 години (від 6 до 9 днів) у діапазоні доз від 1 мг/кг до 30 мг/кг. Середні значення кліренсу були подібними для різних доз, коливаючись від 0,12 до 0,14 мл/кг/год. Фармакокінетичні дослідження одноразової внутрішньовенної дози на макаках Після одноразового внутрішньовенного введення дози макакам сотатерцепт продемонстрував лінійну фармакокінетику із середнім $t_{1/2}$ сотатерцепту в діапазоні від 217 до 253 годин (9-11 днів) у діапазоні доз від 1 мг/кг до 30 мг/кг. Підшкірний шлях введення ФК сотатерцепту оцінювали після підшкірного введення щурам і макакам. Загалом, не було суттєвих відмінностей у ФК сотатерцепту після підшкірного введення залежно від статі у досліджуваних видів тварин після введення одноразової та багаторазової дози. Фармакокінетичні дослідження одноразового підшкірного введення на щурах Одноразове підшкірне введення сотатерцепту у дозі 3, 10 або 30 мг/кг щурам призвело до приблизно пропорційного дозі збільшення площі під кривою «концентрація-час» (AUC) і C_{max}. Фармакокінетичні дослідження одноразового підшкірного введення на макаках Одноразове підшкірне введення сотатерцепту макакам у дозі 1, 10 або 30 мг/кг призводило до менш пропорційного дозі збільшення значень AUC і C_{max}. Фармакокінетичні дослідження повторних доз Експозицію сотатерцепту після підшкірного введення кількох доз оцінювали в GLP дослідженнях на щурах, вагітних кролицях і яванських макаках. Повторне введення дози проводили один раз на тиждень у щурів і кролів, і один раз на два тижні у макак на основі періоду напіввиведення сотатерцепту, що спостерігався у щурів (4-8 днів), кролів (2-3 дні) і макак (7-9 днів). Фармакокінетичні дослідження повторних доз на щурах ФК сотатерцепту при повторних дозах оцінювали після щотижневого підшкірного введення щурам у дозах 0,3, 3 і 30 мг/кг у рамках 3-місячного GLP дослідження токсичності. У день 1 системна експозиція сотатерцепту зростає приблизно пропорційно дозі та менш пропорційно дозі на день 92. Жодних помітних відмінностей у експозиції за статтю не було, за винятком дози 3 мг/кг на день 92, де експозиція у
--	---

самців була в 2,4 рази вищою, ніж експозиція у самок, можливо, через присутність АТП в деяких зразках, отриманих у 92 день. Накопичення сотатерцепту в сироватці крові спостерігалось лише при дозі 0,3 мг/кг із коефіцієнтом накопичення (R_c) 2,6. На накопичення при більш високих дозах могла вплинути наявність

АТП. Незважаючи на те, що деякі тварини, позитивні на АТП, здавалося, підтримували рівень препарату, АТП загалом призводили до зменшення експозиції, коротшого періоду напіввиведення та мінімальних коефіцієнтів накопичення. Загальний рівень АТП-позитивних серед всіх тварин, які отримували сотатерцепт під час фази дозування, становив 43,6 %.

Фармакокінетичні дослідження повторних доз на кролях
ФК сотатерцепту при повторних дозах оцінювали після щотижневого підшкірного введення вагітним кролицям у дозах 0,5, 1,5 та 5 мг/кг. Після першої та останньої дози (7 день вагітності та 14 день вагітності) C_{max} і AUC_{0-168h} збільшувалися приблизно пропорційно дозі в діапазоні доз. Очевидний $t_{1/2}$ коливався від 97,6 до 205,5 годин (4,1-8,6 днів) після першої дози і був коротшим після другої дози зі значеннями в діапазоні від 47,6 до 85,2 години (2,0-3,6 дня). Накопичення не спостерігалось або воно було мінімальним з R_c в діапазоні від 0,9 до 1,6. АТП були виявлені у 40,6% тварин, які отримували сотатерцепт. Для підгрупи тварин ТК антитіла вплинули на експозицію сотатерцепту у 3 із 9 тварин.

Фармакокінетичні дослідження повторних доз на маках

ФК сотатерцепту при повторному введенні оцінювали після кожного двотижневого підшкірного введення макахам в рамках 27-тижневого GLP дослідження токсичності. Сотатерцепт застосовували в дозах 10, 30 і 50 мг/кг. Пов'язаних зі статтю відмінностей у експозиції не спостерігалось. Значення C_{max} збільшувалися приблизно пропорційно дозам до 30 мг/кг після першої та останньої дози (183 день дослідження), тоді як при 50 мг/кг значення C_{max} збільшувалося більше, ніж пропорційно дозі, після першої дози, та менше, ніж пропорційно дозі, після останньої дози. AUC_{0-336h} збільшилася приблизно пропорційно дозі після першої та останньої доз. Протягом дослідження спостерігалися тривалі експозиції з мінімальним накопиченням від першої до останньої доз (середній R_c становив 1,46). Антитіла до сотатерцепту були виявлені у 16,7%-33,3% тварин, яким вводили дози, причому у однієї АТП-позитивної тварини спостерігалася зниження експозиції на 183-й день. Подібну інтерпретацію фармакокінетики також було отримано в результаті 9-місячного дослідження токсичності при повторних дозах

	після підшкірного введення сотатерцепту макакам кожні 2 тижні.
3) розподіл	Сотатерцепт — це терапевтичний білок злиття з розрахунковою молекулярною масою (на основі амінокислотної послідовності) гомодимера сотатерцепту 78 кілодальтон (кДа), який повністю складається з амінокислот природного походження. Очікується, що його розподіл в тканинах буде обмеженим та аналогічним моноклональному антитілу. Отже, типові дослідження розподілу сотатерцепту у доклінічних видів не проводились. ФК повторних доз сотатерцепту оцінювали після щотижневого підшкірного введення вагітним кролицям у дозах 5, 15 та 50 мг/кг. Сотатерцепт був виявлений у зразках сироватки плода при кожному рівні дози на 29-й день вагітності, що вказує на те, що до кінця вагітності білок злиття може долати плацентарний бар'єр. Концентрації сотатерцепту у сироватці плода коливалися від 1% до 39% материнської концентрації. У дослідженні токсичності для до- і постнатального розвитку у щурів сотатерцепт вводився щурам з лактацією. Було виявлено, що сотатерцепт впливає на потомство, що перебуває на грудному вигодовуванні, що свідчить про те, що сотатерцепт потрапляє у молоко щурів.
4) метаболізм	Сотатерцепт — це білковий терапевтичний препарат, який повністю складається з природних амінокислот, і очікується, що типові протеолітичні шляхи будуть основним шляхом катаболізму. Традиційні дослідження метаболізму сотатерцепту згідно з поточними рекомендаціями ICH S6 (R1) щодо доклінічної оцінки безпеки біотехнологічних фармацевтичних препаратів не проводились.
5) виведення	Сотатерцепт — це білковий терапевтичний препарат, який повністю складається з природних амінокислот, і очікується, що його виведення буде подібним до моноклональних антитіл. Досліджень виведення сотатерцепту у доклінічних видів і людини не проводилося.
6) фармакокінетичні взаємодії (доклінічні)	Як білковий терапевтичний препарат, очікується, що сотатерцепт буде катаболізуватись до амінокислот шляхом загальних процесів деградації білка та не виводитися через нирки або печінку, отже, очікується, що на сотатерцепт не впливатимуть потенційні взаємодії між лікарськими засобами, які виникають для маломолекулярних сполук через взаємодію з метаболічними ферментами та транспортерами. Крім того, очікується, що вплив сотатерцепту на ферменти, що метаболізують ліки і транспортери буде низькими, оскільки не передбачається модуляція рівнів цитокінів на основі його механізму дії. Таким чином, дослідження, які б описували потенціал сотатерцепту пригнічувати або індукувати ферменти та транспортери, що метаболізують лікарські засоби, не проводились і не потрібні.

7) інші фармакокінетичні дослідження	Жодних інших ФК досліджень не проводилося.
4. Токсикологія:	
1) токсичність у разі одноразового введення	Сотатерцепт: шури лінії Спрег-Доулі, яким ввели одноразову внутрішньовенну ін'єкцію (10 і 30 мг/кг) сотатерцепту плюс контрольна група Після 4-тижневого дослідження внутрішньовенної токсичності на щурах, де надниркові залози були визначені як цільовий орган, було проведено не-GLP пошукове дослідження, щоб оцінити тривалість пов'язаної із сотатерцептом токсичності в наднирковій залозі після одного внутрішньовенного введення самкам щурів лінії Спрег-Доулі. Дванадцять з контрольної групи і 14 самок щурів лінії Спрег-Доулі/групі, які отримували лікування, вводили разові внутрішньовенні дози 10 або 30 мг/кг сотатерцепту. Оцінювані параметри обмежувалися дослідженнями анатомічної патології. У 8 і 28 день дослідження половину тварин з кожної групи (6 з контрольної та 7 з групи, що отримувала лікування) піддавали евтаназії, надниркові залози, печінку, нирки та підшлункову залозу збирали, а надниркові залози згодом досліджували гістоморфологічно. Не було виявлено жодних змін у загальному стані або вазі органів, пов'язаних із досліджуваними матеріалами. На 8-й день дослідження не було жодних гістоморфологічних змін надниркових залоз, пов'язаних із досліджуваним препаратом. Однак на 28-й день дослідження спостерігався помірний кортикальний некроз із пов'язаною мінералізацією в надниркових залозах в 1 із 7 тварин, які отримували 10 мг/кг, і у 3 із 7 тварин, які отримували 30 мг/кг. Виявлені зміни в надниркових залоз становили приблизно від 30 до 70% площі кори надниркових залоз, і були двосторонніми в усіх випадках. Результати були зосереджені в пучковій або ретикулярній зоні з повним збереженням зони клубочка. Мозкова речовина надниркових залоз, яка різною мірою була присутня в досліджуваних зрізах, не була уражена. За умов цього дослідження рівень, що не викликає видимих негативних ефектів (NOEL) не було встановлено.
2) токсичність у разі повторних введень	Підшкірне введення шурам Сотатерцепт: 3-місячне дослідження підшкірної токсичності на щурах з 1-місячним відновленням Метою цього GLP дослідження було оцінити токсичність сотатерцепту при введенні один раз на тиждень протягом 3 місяців самцям і самкам щурів лінії Спрег-Доулі підшкірно. Крім того, дослідження було розроблено для вивчення оборотності будь-якої токсичності, пов'язаної з лікуванням, протягом 1-місячного періоду без лікування. Щурам лінії Спрег-Доулі (15 на статтю/групу) вводили 0,3, 3 або 30 мг/кг сотатерцепту підшкірно один раз на тиждень протягом 3 місяців (загалом 13 доз). П'ять щурів на

	стать/групу утримувалися протягом 1-місячного періоду без лікування. На момент введення першої дози щурам було приблизно від 6 до 8 тижнів. Оцінка токсичності базувалася на смертності, клінічних спостереженнях, масі тіла, споживанні їжі, визначеннях стероїдних гормонів (тільки у самок) та клінічних і анатомічних оцінках патології. Визначали сироваткові концентрації сотатерцепту (тварини, які отримували лікування) та імуногенність (АТП) (тварини, які отримували лікування та з контрольної групи). Не було жодних незапланованих смертей, клінічних ознак або змін у масі тіла, параметрах аналізу сечі чи рівнях фолікулостимулюючого гормону, пов'язаних із досліджуваними матеріалами. Протягом періоду дозування пов'язане з досліджуваним препаратом збільшення споживання їжі спостерігалось у самок при $\geq 0,3$ мг/кг один раз на тиждень за відсутності впливу на масу тіла, і тому мало номінальне токсикологічне значення. Наприкінці періоду введення дози (90-й день дослідження) гематологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, що фармакологічно опосередковані, зазвичай включали помірне збільшення показників маси циркулюючих еритроцитів (еритроцитів, ширини розподілу еритроцитів (RDW) та/або HGB) і зниження середнього об'єму еритроцитів (MCV) і середнього гемоглобіну еритроцитів (MCH) при $\geq 0,3$ мг/кг один раз на тиждень, збільшення ретикулоцитів при ≥ 3 мг/кг один раз на тиждень та/або збільшення об'єму тромбоцитів при 30 мг/кг один раз на тиждень, які не були несприятливими. Результати клінічної хімії обмежувалися мінімальним збільшенням рівня азоту сечовини крові (що залишалося в межах діапазону історичних контрольних значень) при 30 мг/кг один раз на тиждень. У тварин, підданих розтину на 90-й день дослідження, посмертні зміни, що відбуваються при ≤ 3 мг/кг раз на тиждень, не вважалися несприятливими на основі низької частоти, а також характеру та ступеня змін. Сотатерцепт добре переносився в місцях підшкірної ін'єкції. Зменшення маси серця при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень у самців і самок, і збільшення маси печінки при дозі 30 мг/кг раз на тиждень у самок відбувалися за відсутності гістологічного кореляту і не вважалися несприятливими при будь-якому рівні дози. Пов'язані з досліджуваним препаратом ефекти в яєчках включали мінімальний або помірний гіпосперматогенез при дозах 0,3 мг/кг (1 тварина) і 30 мг/кг раз на тиждень, а також асперматогенез з мінімальними інфільтраціями мононуклеарних клітин і гігантськими клітинами сперматид при дозі 3 мг/кг раз на тиждень (1 тварина), що корелювало з масою епідидиму та зменшенням розміру яєчка/насінневого
--	--

пухирця при дозі 3 мг/кг раз на тиждень, а також легкою мультифокальною односторонньою атрофією яєчка при дозі 30 мг/кг раз на тиждень. У корі надниркових залоз легкий, вогнищевий або дифузний застій спостерігався при дозі $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень, а мультифокальна мінералізація кори надниркових залоз і збільшення маси надниркових залоз спостерігалися при дозі 30 мг/кг раз на тиждень. Зміни з боку нирок включали мінімальний мембранозний або мембранопрولیферативний гломерулонефрит і мінімальну або помірну тубулярну базофілію при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень, а також легку/мінімальну вогнищеву каналцеву дегенерацію/атрофію з дилатацією каналців, інтерстиціальний фіброз та/або мононуклеарну запальну клітинну інфільтрацію при 30 мг/кг раз на тиждень, що корелювало з накопиченням рідини поряд із нирками, що відзначалося макроскопічно, а також зменшення ваги нирок при 30 мг/кг раз на тиждень. Хоча ці зміни в нирках спочатку пояснювали відкладенням імунного комплексу внаслідок утворення АТП, додаткове дослідження показує, що опосередкована сотатерцептом ниркова токсичність є прямим ефектом.

Протягом періоду без лікування та під час розтину після нього (120-й день дослідження) результати, пов'язані з досліджувальним препаратом, були обмежені помірним, однобічним, дифузним або локально поширеним асперматогенезом у яєчках 2 із 5 самців при дозі 30 мг/кг раз на тиждень, що відповідало змінам яєчок, що спостерігалися під час лікування. Маса серця, зміни надниркових залоз і нирок продемонстрували відновлення при всіх дозах після періоду без лікування.

Дані про концентрацію сотатерцепту в сироватці визначали до введення дози (найнижча) на 7-й день дослідження (після першої дози), на 14, 28, 56, 84, 90 (після останньої дози) і 120 (наприкінці періоду без лікування) дні. Дані ТК не включали площу під кривою або C_{max} через обмежену вибірку.

Концентрації в сироватці крові, виміряні протягом періоду дозування, показали значну варіацію серед окремих тварин на кожному рівні дози. Ці варіації вважалися послідовними з розвитком АТП у підгрупі тварин. Загальний рівень позитивних результатів для відповідей АТП на основі значень ELISA, що перевищували поріг позитивного контролю, становив 51 з 88 (58%) оцінених тварин. Рівень позитивних відповідей на АТП на основі аналізу на специфічність становив 7 із 83 (8,4%). Порівняння фармакокінетики даних окремих тварин і даних про АТП у тварин у період без лікування показало високий ступінь кореляції між тваринами, які не підтримували концентрацію сотатерцепту вище межі кількісного визначення протягом періоду дозування, та тваринами, які мали позитивні

значення АТП за ELISA, незалежно від результату в компоненті специфічності аналізу імуногенності (АТП). Підсумовуючи, несприятливі результати, пов'язані з досліджуванним препаратом, були обмежені тваринами з дозою 30 мг/кг раз на тиждень, і включали тубулоінтерстиціальні та клубочкові зміни в нирках, мінералізацію кори надниркових залоз та атрофію або гіпосперматогенез у яєчках. Маса серця, зміни надниркових залоз і нирок продемонстрували відновлення при всіх дозах після періоду без лікування.

На відміну від цього, тестикулярні результати при дозі 30 мг/кг раз на тиждень не були оборотними. Гломерулярний нефрит спочатку вважався наслідком відкладення імуного комплексу, пов'язаного з імуногенністю (АТП), однак у наступному дослідженні на щурах було встановлено, що це, ймовірно, прямий токсичний ефект сотатерцепту. За умов цього дослідження та на основі несприятливого характеру та повної оборотності ефектів при дозі ≤ 3 мг/кг, рівень, при якому не спостерігається побічних реакцій (NOAEL) становив 3 мг/кг раз на тиждень, що відповідає розрахунковій площі під кривою концентрація-час від нуля до 168 годин (AUC_{0-168h}) 2090 мкг*год/мл (у 2 рази більше клінічної експозиції при максимальній рекомендованій дозі для людини). [MRHD]).

Сотатерцепт: 3-місячне токсикокінетичне дослідження сотатерцепту шляхом підшкірного введення щурам з 1-місячним періодом відновлення

Цілі цього GLP дослідження полягали у визначенні ТК та імуногенності (АТП) сотатерцепту, а також потенційної користі сечових біомаркерів ниркової токсичності для моніторингу змін нирок, коли сотатерцепт вводили підшкірно щурам лінії Спрег-Доулі раз на тиждень протягом 3 місяців з наступним 1-місячним періодом без лікування.

Щурам лінії Спрег-Доулі (16 на стать/групу) вводили 0,3, 3 або 30 мг/кг сотатерцепту або тільки носій підшкірно кожний тиждень протягом 3 місяців (загалом 14 доз). Шість щурів на стать/групу були призначені для збору зразків ТК/імуногенності (АТП) і залишалися протягом 1-місячного періоду без лікування.

Оцінка токсичності базувалася на смертності, клінічних спостереженнях, масі тіла, клінічній патології (гематологія, клінічна хімія, біомаркери сечі), а також загальній та анатомічній оцінці патології нирок. Визначали сироваткові концентрації сотатерцепту (в контрольній групі та у тварин, які отримували лікування) та АТП (у тварин, які отримували лікування).

Не було жодних позапланових смертей, пов'язаних із досліджуванним препаратом. Один самець при дозі 30 мг/кг раз на тиждень був знайдений мертвим у день дослідження

57. Зв'язок цієї смерті з лікуванням не визначений, оскільки гематологічні та хімічні зміни (креатинін і азот сечовини крові (BUN)) у день дослідження були подібними до значень у інших тварин у дозі 30 мг/кг раз на тиждень, а причина смерті не була очевидною на основі макроскопічного дослідження нирок.

Під час періоду введення дози результати клінічних спостережень, пов'язані з досліджуванним препаратом, обмежувалися роздутим животом, що спостерігалось у двох тварин із дозуванням 30 мг/кг раз на тиждень. Незначне збільшення середньої маси тіла спостерігалось у самок при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень протягом періоду дозування, та зберігалось при 30 мг/кг раз на тиждень протягом періоду без лікування.

Починаючи приблизно з 29 дня дослідження і зазвичай триваючи до 93 дня дослідження, гематологічні зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, що фармакологічно опосередковані, зазвичай включали легке підвищення показників маси циркулюючих еритроцитів (вміст RBC, HCT і HGB), збільшення RDW і ретикулоцитів, а також зниження MCH, середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитах (MCHC) та/або MCV на $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень і зниження тромбоцитів при 30 мг/кг раз на тиждень, які мали мінімальне токсикологічне значення. Більшість цих результатів зберігалися у самців при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень і 30 мг/кг раз на тиждень у самок протягом періоду без лікування. Не було жодних змін у клінічній хімії, пов'язаних із досліджуванним препаратом.

У щурів, які отримували сотатерцепт, спостерігалось залежне від дози та часу підвищення рівня біомаркерів пошкодження нирок у сечі – остеопонтину, ліпокаліну-2 та альбуміну. Спостерігалось помірне підвищення (приблизно в 5 разів порівняно з контрольною групою) остеопонтину та ліпокаліну-2 протягом періоду дозування (93 день дослідження), переважно при 30 мг/кг раз на тиждень. Збільшення альбуміну (приблизно в 50 разів порівняно з контрольною групою) було найбільш очевидним при дозі 30 мг/кг раз на тиждень протягом періоду без лікування (121 день дослідження).

Наприкінці періоду введення дози (93 день дослідження) збільшення лівої нирки (пов'язане з накопиченням рідини в нирковій капсулі), що спостерігалось у двох тварин із дозою 30 мг/кг раз на тиждень, корелювало з мінімальним або помірним кістозним розширенням і фіброзом ниркової капсули. Мінімальний або помірний мембранопрولیферативний гломерулонефрит спостерігався у самців при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень і у самок при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень. Мінімальна або помірна хронічна прогресуюча нефропатія спостерігалася у самок при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень, а мінімальна або помірна інтерстиціальна

мінералізація спостерігалася у самців і самок при 30 мг/кг раз на тиждень.

Наприкінці періоду без лікування (121-й день дослідження) макроскопічні та мікроскопічні зміни нирок після періоду введення дози не зникли, і мінімальна або помірна хронічна прогресуюча нефропатія тепер була присутня як у самців, так і у самок при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень.

Однак не було помітних змін ниркових біомаркерів при ≤ 3 мг/кг раз на тиждень, і, на основі низької тяжкості та частоти гістологічних результатів, зміни нирок при ≤ 3 мг/кг раз на тиждень не вважалися негативними.

Загалом концентрації сотатерцепту були нижчими у тварин, які були АТП-позитивними. У тварин, що проходили фармакокінетичне дослідження (ТК) концентрація сотатерцепту в сироватці крові була нижчою за межу кількісного визначення при дозі 3 мг/кг у 2/4 АТП-позитивних тварин на 92 день дослідження, та у 3/5 АТП-позитивних тварин на 121 день дослідження. При дозі 30 мг/кг лише 1 тварина виявилася позитивною на АТП, і її сироваткові концентрації були нижчими за межу кількісного визначення, починаючи з 92 дня дослідження.

Концентрації сотатерцепту в сироватці крові у тварин основного дослідження після припинення на 93 день дослідження були подібними до концентрацій ТК через 24 години після введення дози на 92 день дослідження. Однак у групі дозування 0,3 і 3 мг/кг було 4/5 і 7/13 АТП-позитивних тварин відповідно, у яких концентрації сотатерцепту були нижчими за межу кількісного визначення. При дозі 30 мг/кг у основних досліджуваних тварин концентрації сотатерцепту були значно знижені у АТП-позитивних тварин. У дні дослідження 92/93 загальна частота АТП при 0,3, 3 і 30 мг/кг раз на тиждень становила 19 %, 65 % і 28 % відповідно.

Після багаторазового введення концентрації сотатерцепту в сироватці крові збільшувалися в деяких групах доз. Співвідношення AUC_{0-168h} 92-го дня дослідження до 1-го дня при дозах 0,3, 3 та 30 мг/кг раз на тиждень становили 3,1, 1,4 та 1,7 у самців відповідно, та 2,3, 0,55, 0,92 у самок відповідно. Присутність АТП у зразках 92-го дня дослідження, ймовірно, сприяла зниженню коефіцієнтів накопичення в групах 3 і 30 мг/кг раз на тиждень.

Спроба співвіднести наявність АТП з гломерулярними змінами в усіх групах, які отримували сотатерцепт, була невдалою та продемонструвала протилежне: у тварин, які були негативними на АТП, загалом рівень альбуміну в сечі підвищується та починається гломерулонефрит.

Натомість клубочкові зміни корелювали з підвищенням рівня сотатерцепту в сироватці крові на 93 день, що вказує на те, що клубочкові зміни, ймовірно, є прямим ефектом сотатерцепту і не пов'язані з відкладенням імунного комплексу.

Підсумовуючи, застосування сотатерцепту раз на тиждень протягом 3 місяців поспіль у дозах 0,3, 3 та 30 мг/кг призвело до підвищення маси тіла, клінічної патології та необоротних змін нирок при сироватковій концентрації (92 день дослідження), подібні до тих, що спостерігалися в попередньому 3-місячному дослідженні підшкірної токсичності на щурах, проведеному в тих самих дозах. В обох 3-місячних дослідженнях на щурах рівень NOAEL становив 3 мг/кг раз на тиждень (AUC_{0-168h} 2090 мкг*год/мл, у 2 рази більше клінічної експозиції при MRHD). У поточному дослідженні підвищення рівня сечових біомаркерів ураження нирок остеопонтину, ліпокаліну-2 та альбуміну загалом корелювало з несприятливою нирковою токсичністю, яка виникала при дозі 30 мг/кг раз на тиждень, а показники нирок при дозах ≤ 3 мг/кг раз на тиждень не були несприятливими на основі низької частоти та тяжкості гістологічних результатів. Крім того, було показано, що гломерулярна токсичність була найбільшою у АТП-негативних тварин, що свідчить про те, що сотатерцепт може мати прямий токсичний вплив на нирки.

Внутрішньовенне введення щурам

Сотатерцепт: дослідження для визначення потенційної токсичності сотатерцепту при введенні самцям і самкам щурів лінії Спрег-Доулі шляхом внутрішньовенного введення один раз на тиждень протягом 4 тижнів з наступним 4-тижневим відновленням

Метою цього GLP дослідження було визначити потенційну токсичність сотатерцепту при введенні самцям і самкам щурів лінії Спрег-Доулі шляхом внутрішньовенного введення один раз на тиждень протягом 4 тижнів.

Щурам лінії Спрег-Доулі (15 на стать/групу) вводили 1, 10 або 30 мг/кг сотатерцепту внутрішньовенно один раз на тиждень протягом 4 тижнів (загалом 4 дози). П'ять щурів на стать/групу утримувалися протягом 4-тижневого періоду без лікування.

Оцінка токсичності базувалася на смертності, клінічних спостереженнях, масі тіла, споживанні їжі та клінічних і анатомічних дослідженнях (включаючи мазок кісткового мозку та оцінку репродуктивної здатності самців). У зразках, що підлягали лікуванню визначали плазмові концентрації сотатерцепту та АТП.

Було 2 випадки незапланованої смерті, які мали не визначений зв'язок з лікуванням. Одного самця, який отримував дозування 10 мг/кг раз на тиждень було знайдено мертвим на 19-й день дослідження після виявлення крові в сечі на 18-й день дослідження. Одного самця, який отримував дозування 30 мг/кг раз на тиждень піддали евтаназії у предсмертному стані на 23-й день дослідження. Гематологічні зміни та багато посмертних змін у померлого

самця з дозуванням 30 мг/кг раз на тиждень узгоджувалися з результатами, що спостерігалися у тварин із дозою 30 мг/кг раз на тиждень під час запланованого розтину на 29 день дослідження. Причина смерті або передсмертний стан тварин із незапланованою смертю не були визначені.

Не було жодних клінічних спостережень, пов'язаних із досліджуваним препаратом, або змін у масі тіла, споживанні їжі чи параметрах аналізу сечі.

На 29 день дослідження гематологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, що фармакологічно опосередковані, зазвичай включали помірне підвищення показників маси циркулюючих еритроцитів (вміст RBC, HCT і HGB) при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень. Ці зміни корелювали з незначним збільшенням загальної кількості еритроїдних клітин у самців при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень та у самок при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень порівняно з контрольною групою, які оцінювали за допомогою якісної та кількісної мікроскопічної оцінки мазків кісткового мозку. Додаткові гематологічні зміни включали легке збільшення ретикулоцитів при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, легке збільшення базофілів (тільки при 10 мг/кг раз на тиждень) і велику кількість незабарвлених клітин (при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень) у самців, а також легке зниження MCH при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, MCHC при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень і тромбоцитів у самців при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень, які мали мінімальне токсикологічне значення. Помірне підвищення еритроцитів, HGB і HCT і зниження MCH зберігалося на рівні ≥ 10 мг/кг раз на тиждень протягом 1-місячного періоду без лікування. Наприкінці періоду без лікування не було виявлено мікроскопічних змін у кістковому мозку, які б відповідали цим змінам. Усі результати гематологічних досліджень та досліджень кісткового мозку не були несприятливими.

Спостерігалось дуже незначне або помірне підвищення середнього рівня аланінамінотрансферази (АЛТ) (у 2-3 рази порівняно з контрольною групою), аспартатамінотрансферази (АСТ) (у 1-2 рази порівняно з контрольною групою) і лужної фосфатази (ЛФ) (у 1 раз вище контрольної групи) при 10 мг/кг раз на тиждень і 30 мг/кг раз на тиждень у самок на 29 день дослідження. Середнє значення АСТ у самок у дозі 1 мг/кг раз на тиждень також було значно вищим, ніж у контрольній групі (у 1 раз більше, ніж у контрольній групі). У самців зміни рівня печінкових ферментів (АЛТ підвищилася лише незначною мірою лише при дозі 10 мг/кг кожні 1 тиждень) були менш помітними, ніж у самок на 29-й день дослідження.

Після 1-місячного періоду без лікування (57-й день дослідження) середні значення аспартатамінотрансферази та лужної фосфатази були збільшені в 2 рази порівняно з контрольною групою при 30 мг/кг раз на тиждень у самок. На

57-й день дослідження у самців значення лужної фосфатази (ЛФ) були збільшені в 2 рази порівняно з контрольною групою лише при дозі 10 мг/кг раз на тиждень. Оскільки підвищення було незначним та за відсутності мікроскопічних змін у печінці, які відповідали б цим змінам, підвищення рівня печінкових ферментів не було несприятливим. У подальших підшкірних 3-місячних дослідженнях токсичності на щурах помітного підвищення рівня печінкових ферментів не спостерігалось при подібних концентраціях у сироватці/плазмі.

Зміни анатомічної патології, пов'язані з досліджуванним препаратом, спостерігалися в яєчках/придатках яєчок при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень, а також у підшлунковій залозі та наднирковій залозі при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень. Крім того, спостерігалось збільшення маси яєчників при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень та зменшення маси серця при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, маси нирок при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень та ваги матки при дозі 30 мг/кг раз на тиждень, які відбувалися за відсутності відповідних мікроскопічних змін і не були несприятливими. У яєчках при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень мікроскопічно виявлені гранульоми сперматозоїдів, корелювали з макроскопічно виявленими вузликами/вогнищами в епідидимідах. Крім того, дегенерація яєчок (розширення каналців, зменшення кількості сперматид у сім'яних каналцях, гігантські клітини сперматид) часто корелювала з наявністю гранульом сперматозоїдів і збільшенням середньої маси яєчка. У надниркових залозах самок при дозах ≥ 1 мг/кг раз на тиждень некроз у корі та мозковій речовині корелював зі збільшенням маси надниркових залоз, а також з їх збільшенням/знебарвленням та вогнищами, які були помічені макроскопічно. У підшлунковій залозі апоптоз ацинарних клітин, виснаження гранул зимогену та атрофія ацинусів підшлункової залози виникали при дозі ≥ 1 мг/кг раз на тиждень і, як правило, були від мінімального до легкого ступеня тяжкості. Через низьку вираженість змін підшлункової залози в діапазоні доз, наявність апоптозу ацинарних клітин у щурів з контрольною групи і щурів, які отримували лікування, а також через те, що подібні ефекти в підшлунковій залозі не спостерігалися в наступних дослідженнях підшлункової залози на щурах при дозах до 30 мг/кг раз на тиждень або у макак при будь-якому рівні дози, зміни підшлункової залози не були пов'язані з лікуванням сотатерцептом. Сотатерцепт добре переносився у місцях ін'єкції.

Наприкінці 1-місячного періоду без лікування (57 день дослідження) зміни підшлункової залози при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, які не вважалися пов'язаними з досліджуванним препаратом, і зменшення маси серця, гранульома сперматозоїдів у придатках яєчок/дегенерація яєчок і некроз

надниркових залоз/хронічний некроз при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень не зникли.

При оцінці репродуктивної функції самців зміни параметрів сперми загалом корелювали з гістологічними результатами яєчок, пов'язаними з досліджуванним препаратом. Зменшення рухливості сперматозоїдів і кількості сперматозоїдів у придатках яєчка, а також збільшення фрагментації сперматозоїдів спостерігалось при дозі 30 мг/кг раз на тиждень наприкінці періоду дозування. Наприкінці періоду без лікування підвищена фрагментація сперматозоїдів і зниження рухливості сперматозоїдів спостерігалися у 2 із 5 тварин лише при застосуванні 10 мг/кг раз на тиждень.

Концентрації сотатерцепту в плазмі визначали на 2-й і 3-й дні дослідження після першої дози, перед введенням дози на 7-й день дослідження та перед кожним розтином.

При дозах 1, 10 і 30 мг/кг раз на тиждень антитіла до препарату (АТП) були виявлені на 29 день дослідження у 7/10, 1/10 і 2/10 тварин, і на 57 день дослідження у 4/10, 0/10 і 2/10 тварин відповідно. Антитіла з вищим титром, виявлені на 29 день дослідження, які потім зберігалися до 57 дня дослідження, як правило, асоціювалися з нижчими концентраціями сотатерцепту в плазмі. При дозі 1 мг/кг раз на тиждень концентрація сотатерцепту в плазмі була нижчою за межу кількісного визначення у 2/10 тварин на 29 день дослідження, та у 7/10 тварин на 57 день дослідження.

Підсумовуючи, внутрішньовенне введення сотатерцепту в дозах 1, 10 і 30 мг/кг раз на тиждень протягом 4 тижнів призвело до несприятливих змін при всіх рівнях доз. Некроз надниркових залоз спостерігався у самок при дозі ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, а при дозі ≥ 10 мг/кг раз на тиждень відбулися 2 незаплановані смерті, зв'язок з лікуванням яких не визначений, а також гістоморфологічні зміни в яєчках/придатках яєчок. Зміни як надниркових залоз, так і яєчок не продемонстрували оборотності при дозах ≥ 10 мг/кг раз на тиждень після 4-тижневого періоду без лікування. Виходячи з цих результатів, NOAEL після внутрішньовенного введення становила < 1 мг/кг раз на тиждень.

Підшкірне введення макакам

Сотатерцепт: 3-місячне дослідження підшкірної токсичності на яванських макаках із 2-місячним відновленням

Мета цього GLP дослідження полягала в тому, щоб оцінити потенційну токсичність і ТК сотатерцепту при підшкірному введенні кожні 2 тижні протягом 3 місяців самцям і самкам яванських макак. Крім того, дослідження було розроблено для вивчення оборотності будь-якої токсичності, пов'язаної з лікуванням, протягом 2-місячного періоду без лікування.

Яванським макакам (від 4 до 6 особин на статтю/групу) вводили сотатерцепт у дозі 10, 30 або 50 мг/кг підшкірно кожні 2 тижні протягом 3 місяців (загалом 7 доз). Дві тварини кожної статі з контрольної групи та групи з високою дозою були залишені протягом 2-місячного періоду без лікування. Оцінка токсичності ґрунтувалася на смертності, клінічних спостереженнях, масі тіла, споживанні їжі, електрокардіограмі та офтальмологічних дослідженнях, а також клінічній та анатомічній оцінці патології. Визначали плазмові концентрації сотатерцепту (контрольних та лікованих зразків) і АТП (ліковані зразки).

Усі тварини вижили до запланованої евтаназії. Не було жодних клінічних спостережень, пов'язаних із досліджуваним препаратом, чи змін маси тіла, споживання їжі, офтальмології, ЕКГ, коагуляції чи аналізу сечі.

Фармакологічно опосередковані гематологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, включали помірне збільшення показників маси циркулюючих еритроцитів (що зазвичай включало HGB, HCT, RBC і RDW) і ретикулоцитів, а також зниження MCH і MCHC, які зазвичай відбувалися при всіх дозах і мали мінімальне токсикологічне значення. Ці зміни зникли протягом періоду без лікування.

Зміни клінічної хімії, пов'язані з досліджуваним препаратом, при дозі ≥ 10 мг/кг один раз на два тижні обмежувалися мінімально підвищеними середніми значеннями креатиніну та азоту сечовини крові (BUN). Наприкінці періоду без лікування (148 день дослідження) середні значення креатиніну підвищувалися тільки при дозі 50 мг/кг раз на два тижні лише у самок. У всіх випадках значення креатиніну та BUN у тварин, які отримували лікування, залишалися в межах діапазону даних лабораторного контролю. Таким чином, ці зміни не вважалися несприятливими та мали мінімальне токсикологічне значення.

Не було виявлено жодних змін загальної ваги або ваги органів, пов'язаних із досліджуваним препаратом. Під час термінального розтину (92 день дослідження) гістоморфологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, виникли в нирках при дозі ≥ 30 мг/кг раз на два тижні, та полягали в слабкій або помірній мультифокальній або дифузній мембранопрولیферативній гіперцелюлярності клубочків, що призвело до вторинних тубулярних змін (кортикостомедулярний фіброз, мононуклеарний інфільтрат, тубулярний базофілія та тубулярна екстазія) при 50 мг/кг раз на два тижні. При дозі 30 мг/кг раз на два тижні в групі кінцевої евтаназії ці клубочкові зміни були помірними та спостерігалися у 4/8 макак. При дозі 50 мг/кг раз на два тижні ці зміни були легкими або помірними у всіх макак під час кінцевої евтаназії та легкими у всіх макак у кінці періоду без лікування. Тяжкість і поширення ураження були меншими у тварин, які не отримували лікування, що свідчить

про те, що з часом ураження клубочків зникне. Спочатку вважалося, що ці результати пов'язані з утворенням АТП та відкладенням комплексу антиген/антитіло в клубочках. Проте подальші дослідження показали, що зміни в нирках, ймовірно, були прямим впливом сотатерцепту, а не лише наслідком імунного відкладення.

Найнижчі рівні в плазмі перед введенням дози, отримані через 2, 4, 8 і 12 тижнів, залишалися стабільними протягом усього періоду введення. Порівняння мінімальних концентрацій, отриманих за одиничні моменти часу, зібраних до другої дози (день дослідження 14) і перед останньою дозою (день дослідження 84), показало, що групові середні концентрації в плазмі були подібними в обидва дні, і що адекватна експозиція підтримувалася у тварин протягом усього періоду дозування.

АТП були виявлені лише в 1 тварини на 15 день дослідження, і вони не вплинули на експозицію цієї тварини.

На завершення, мінімальні несприятливі клінічні патологічні зміни спостерігалися при всіх дозах, а мембранопроліферативна гіперклітинна гломерула спостерігалася в нирках при дозі ≥ 30 мг/кг раз на два тижні (легкі при дозі 30 мг/кг раз на два тижні, та від легких до помірних при дозі 50 мг/кг раз на два тижні) з вторинними ефектами на ниркові каналці при 50 мг/кг раз на два тижні. Порівняно з результатами кінцевого розтину, тяжкість і розподіл клубочкових змін були меншими у тварин у період без лікування з дозою 50 мг/кг раз на два тижні, що свідчить про те, що з часом ураження клубочків зникне.

Через помірний ступінь гломерулярних змін при дозі 30 мг/кг раз на два тижні, індикацію принаймні часткової реверсії при дозі 50 мг/кг раз на два тижні та відсутність біологічно значущих змін у відповідних клінічних хімічних параметрах NOAEL для цього дослідження становила 30 мг/кг раз на два тижні, що відповідає C_{max} і AUC_{0-312h} на 1 день дослідження 351 мкг/мл та 82 389 мкг*год/мл (32-кратна клінічна експозиція при MRHD) відповідно.

Сотатерцепт: 27-тижневе дослідження підшкірної токсичності на яванських макаках з 13-тижневим відновленням

Метою цього GLP дослідження було визначити потенційну токсичність і ТК сотатерцепту при підшкірному введенні один раз кожні 2 тижні протягом 27 тижнів самцям і самкам яванських макак. Крім того, це дослідження було розроблено для вивчення оборотності будь-якої токсичності, пов'язаної з лікуванням, протягом 13-тижневого періоду без лікування. Яванським макакам (6 на стать/групу) вводили 10, 30 або 50 мг/кг сотатерцепту підшкірно раз кожні 2 тижні протягом 27 тижнів (загалом 14 доз). Три макаки на стать/групу утримувалися протягом 13 тижнів періоду без лікування.

	Оцінка токсичності ґрунтувалася на смертності, клінічних спостереженнях, масі тіла, споживанні їжі, електрокардіограмі та офтальмологічних дослідженнях, а також клінічній та анатомічній оцінці патології. Сироваткові концентрації сотатерцепту та АТП визначали в контрольній групі та групі макак, які отримували лікування. Це дослідження спочатку було розроблено як 9-місячне дослідження з 2-місячним періодом без лікування. Дози були обрані на основі даних 3-місячного дослідження токсичності. Однак після незапланової смерті двох самок, які отримували дозу 30 мг/кг раз кожні 2 тижні, з клінічними та анатомічними патологіями, що свідчать про опосередкований імунними комплексами клубочковий нефрит і ниркову токсичність, дослідження було змінено, щоб припинити введення препарату на 27 тижні, з метою зменшити потенційний вплив реакцій передбачуваної імуногенності (АТП) на самопочуття тварин та інтерпретацію даних. Було зафіксовано 2 незапланові випадки смерті, пов'язані з досліджуваним препаратом. Двох самок з дозою 30 мг/кг раз кожні 2 тижні піддали евтаназії у передсмертному стані на 142 і 156 дні дослідження. Перед припиненням лікування, у цих тварин спостерігались наступні зміни: згорблений і худий вигляд, холодна на дотик шкіра, низька активність, груба шерсть, сильна втрата апетиту та зневоднення, а також від помірного до значного підвищення значень BUN і креатиніну (порівняно з попередніми контрольними групами). Посмертні результати включали помірний або важкий тубулоінтерстиціальний нефрит і гломерулонефрит, які корелювали з вираженим потемнінням нирок і підвищенням BUN і креатиніну. Додаткові посмертні зміни включали помірне лімфоїдне виснаження тимусу в обох тварин. Мінімальний вогнищевий гострий некроз міокарда з мононуклеарними клітинними інфільтраціями, багатовогнищеве хронічне запалення в підшлунковій залозі з вогнищевим артеріїтом і почервоніння надниркових залоз спостерігалось в 1 тварині, яка загинула раніше. У тварин, що вижили, не спостерігалось пов'язаних із сотатерцептом клінічних ознак або впливу на масу тіла, споживання їжі, ЕКГ, офтальмологічні параметри, параметри коагуляції чи аналізу сечі. Гематологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, що фармакологічно опосередковані, включали помірне підвищення показників маси циркулюючих еритроцитів (HGB, HCT і RBC) і ретикулоцитів, які виникали при всіх дозах, зникали протягом періоду без лікування та не були несприятливими. Загальна кількість лейкоцитів і лімфоцитів у контрольних і тварин, які отримували лікування була порівнянною.
--	--

Зміни клінічної хімії, пов'язані з досліджуваним препаратом, у тварин, що вижили, були обмежені легким підвищенням BUN і креатиніну у самок при дозі 50 мг/кг раз кожні 2 тижні, які спостерігалися, починаючи з 152 дня дослідження і тривали до 190 дня дослідження (кінець періоду введення дози). Під час періоду без лікування середні значення BUN і креатиніну знизилися, але залишалися вищими за початковий рівень, а креатинін залишався підвищеним у 1 самки з гломерулонефритом і тубулоінтерстиціальним нефритом.

Під час кінцевого розтину у 190 день дослідження гістоморфологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, спостерігалися при всіх дозах у нирках і тимусі, а також у судинному сплетенні головного мозку при ≥ 30 мг/кг раз кожні 2 тижні.

Тубулоінтерстиціальний нефрит у нирках був присутній при будь-яких дозах, частіше вражав самок, ніж самців, і зростав у частоті та тяжкості (від мінімального до помітного) залежно від дози. Виявлення тубулоінтерстиціального нефриту корелювало з макроскопічними змінами, а саме зміна кольору нирок на блідий/коричневий /плямистий при всіх дозах зі збільшенням середньої маси нирок лише при дозі 50 мг/кг 1 раз кожні 2 тижні. Тубулоінтерстиціальний нефрит характеризувався мультифокальною або спаюваною атрофією каналців із різним ступенем (часто вираженим) інтерстиціального фіброзу. Трихромне фарбування за Массоном, виконане на репрезентативній тканині тварин з тубулоінтерстиціальним нефритом, показало помітне відкладення пухкої сполучної тканини (колагену) в інтерстиції, головним чином розподіленої вздовж кортикальних каналців і навколо клубочків і прилеглих каналців (порівняно з контрольною групою). Асоційовані клубочки іноді були атрофічними та склерозованими. Мінімальна або помірна гломерулярна мембранопроліферативна гіперцелюлярність (гломерулонефрит) спостерігалася переважно при дозах ≥ 30 мг/кг раз кожні 2 тижні, та частіше у самок. Загалом існувала пряма кореляція між тяжкістю тубулоінтерстиціального нефриту з клубочковою мембранопроліферативною гіперцелюлярністю та величиною підвищення BUN і креатиніну у самок з дозою 50 мг/кг раз кожні 2 тижні на 183 день дослідження. Наприкінці періоду без лікування (274 день дослідження) від мінімального до вираженого тубулоінтерстиціальний нефрит та/або мінімальна гломерулярна мембранопроліферативна гіперцелюлярність залишалися присутніми в нирках при ≥ 10 мг/кг раз кожні 2 тижні з частотою, порівнянною з тією, що спостерігалася в кінці періоду введення дози. Тяжкість клубочкової мембранопроліферативної гіперцелюлярності

	зменшилася порівняно з кінцевим розтином, що свідчить про можливе часткове одужання. Наприкінці періоду дозування спостерігалось зниження середньої маси тимуса при дозі 50 мг/кг раз кожні 2 тижні, що корелювало з мінімальним або помірним виснаженням лімфоїдів при дозі ≥ 10 мг/кг раз кожні 2 тижні. Частота татяжкості виснаження лімфоїдів не залежали від дози, але були найбільш вираженими у тварин, які загинули незаплановано. Наприкінці періоду без лікування цей лімфоїдний вияв більше не був присутній у жодній групі доз. У судинному сплетінні на термінальному розтині спостерігалися мінімальні або незначні пінисті інфільтрати макрофагів у 1–2 тварин на групу при дозі ≥ 30 мг/кг раз кожні 2 тижні. Протягом періоду без лікування ця зміна залишалася присутньою з порівнянною частотою та тяжкістю. AUC_{0-336h} і C_{max} збільшувалися пропорційно дозі в досліджуваному діапазоні доз. Сотатерцепт накопичувався в кровообігу після повторного підшкірного введення кожні 2 тижні. На 27-му тижні середні коефіцієнти накопичення становили 1,82 і 1,46 для C_{max} і AUC_{0-336h} відповідно. АТП були постійно виявлені у 8/48 тварин: 2/12 тварин при дозі 10 мг/кг кожні 2 тижні, 2/12 тварин при дозі 30 мг/кг раз кожні 2 тижні та 4/12 тварин при дозі 50 мг/кг раз кожні 2 тижні. В одного самця, якому застосовували дозу 50 мг/кг раз кожні 2 тижні, АТП підвищили кліренс сотатерцепту, що призвело до того, що рівні препарату перед введенням дози були нижчими за межу кількісного визначення, починаючи з 57-го дня дослідження до 183-го дня дослідження (кінець періоду введення дози). У підсумку, введення сотатерцепту яванським макакам протягом 27 тижнів призводило до тубулоінтерстиціального нефриту та/або гломерулонефриту в усіх дозах, причому частота та тяжкість цих станів загалом зростали в залежності від дози. Це корелявало зі збільшенням рівнів BUN та креатиніну у самок з 50 мг/кг раз на 2 тижні після кінцевого розтину і двох самок з 30 мг/кг раз на 2 тижні, які були піддані евтаназії на 21/23 тижнях дослідження у передсмертному стані внаслідок помірної та вираженої ниркової токсичності. Після 13-тижневого періоду без лікування гістоморфологічні зміни нирок показали незначні ознаки відновлення. На відміну від цього, значення BUN і креатиніну знизилися протягом періоду без лікування, що відповідало частковому функціональному відновленню нирок. У судинному сплетінні пінисті інфільтрати макрофагів, які спостерігалися при дозі ≥ 30 мг/кг раз на 2 тижні, мали подібну частоту та тяжкість у тварин, яким робили розтин наприкінці дослідження і в період відновлення. Зменшення лімфоїдної тканини, відмічене під час остаточного розтину при ≥ 10 мг/кг раз на 2 тижні, не
--	---

корелювало зі змінами в циркулюючій загальній кількості лейкоцитів або лімфоцитів і не було присутнє на будь-якому рівні дози при розтині тварин у період без лікування. Базуючись на результатах ниркової функції, наявних у тварин при розтині в період без лікування при всіх дозах, NOAEL для цього дослідження становила < 10 мг/кг раз на 2 тижні.

Сотатерцепт: 9-місячне дослідження підшкірної токсичності на яванських макаках із 2-місячним відновленням

Метою цього дослідження було визначення потенційної токсичності сотатерцепту при введенні раз на 2 тижні протягом 9 місяців яванським макакам у дозах 0, 10, 30 і 50 мг/кг.

На 9-му тижні дослідження (після загалом 4 підшкірних доз) збір даних було призупинено, а саме дослідження припинено, щоб усунути будь-які ускладнення інтерпретації через надзвичайно високу частоту мікроорганізмів *Plasmodium spp.*, ідентифікованих в мазках периферичної крові контрольних і тварин, які отримували лікування. Одна тварина, яка отримувала сотатерцепт у дозі 50 мг/кг раз на 2 тижні, була піддана евтаназії на 5-му тижні дослідження з фульмінантною малярією. Субклінічна інфекція *Plasmodium spp.* була присутня у кількох тварин до початку дослідження (як визначено за допомогою мазків крові), що могло бути наслідком походження тварин із регіону, де інфекція *Plasmodium spp.* була ендемічною серед нелюдиноподібних приматів.

Малоймовірно, що збільшення захворюваності та тяжкості інфекції плазмодієм у цьому дослідженні було пов'язане з досліджуванним препаратом. Жодних доказів імуносупресивної основи для підвищеної сприйнятливості до інфекцій не спостерігалось в жодному з досліджуваних видів тварин, які отримували сотатерцепт.

Не спостерігалось негативного впливу на кількість лейкоцитів периферичної крові або гістоморфологію кісткового мозку в будь-яких досліджуваних видів, які отримували сотатерцепт, і коли молоді щури були заражені гемоціаніном фісурелла (KLH) для оцінки Т-клітиннозалежної гуморальної імунної відповіді (TDAR), щури, які отримували сотатерцепт, змогли створити відповідь імуноглобуліна G (IgG), у порівнянні з контрольною групою.

У мишачих моделях раннього зараження плазмодієм індукований еритропоетином ретикулоцитоз і збільшення кількості еритроцитів прискорювали реплікацію паразитів і збільшували смертність. На відміну від цього, опосередковане IFN- α зниження паразитарного навантаження крові було пов'язане зі зниженням

еритропоезу та ретикулоцитозу. Виходячи з цих даних, цілком ймовірно, що помірний вплив сотатерцепту на дозрівання еритроцитів (незначне оборотне підвищення НСТ, RBC, HGB і кількості ретикулоцитів) збільшив сприйнятливість макак, інфікованих плазмодієм, до розвитку явної малярії.

Сотатерцепт: 9-місячне дослідження токсичності сотатерцепту, введеного підшкірно яванським макакам, з 3-місячним періодом відновлення

Цілі цього GLP дослідження полягали в оцінці потенційної токсичності сотатерцепту при підшкірному введенні яванським макакам протягом 9 місяців (кожні 4 тижні – загалом 10 доз або кожні 2 тижні – загалом 20 доз), а також оцінити відновлення від впливу сотатерцепту протягом періоду без лікування тривалістю щонайменше 3 місяці. Рівні дози були обрані на основі 27-тижневого дослідження токсичності на макаках.

Яванським макакам (4 на стать/групу) вводили носій (ФСБ) або сотатерцепт у дозах 1, 2,6 і 10 мг/кг один раз на чотири тижні (загалом 10 доз) або 10 мг/кг раз на два тижні (загалом 20 доз) підшкірно в об'ємі 0,2 мл/кг. Додаткові 2 макаки на стать були призначені в групи дозування носія, 2,6 і 10 мг/кг раз на 4 тижні, та 10 мг/кг раз на 2 тижні та утримувалися протягом 3-місячного періоду без лікування.

Оцінка токсичності ґрунтувалася на смертності, фармакологічних оцінках безпеки (неврологічний огляд, температура тіла, частота дихання та вимірювання артеріального тиску), клінічних спостереженнях, масі тіла, споживанні їжі, електрокардіограмі та офтальмологічних дослідженнях, а також оцінках клінічної та анатомічної патології (включаючи мазок кісткового мозку). Трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ) була використана для подальшої характеристики змін у судинному сплетінні та нирках. Нирки, судинне сплетення, печінку та легені, зафіксовані формаліном та залиті парафіном, досліджували за допомогою імуногістохімії (ІГХ) (не GLP) для оцінки біорозподілу сотатерцепту та потенційної участі відкладення імунного комплексу в клубочкових і судинних змінах. У зразках контрольної групи і тварин, які отримували лікування визначали сироваткові концентрації сотатерцепту та АТП.

Позапланових смертей, пов'язаних із досліджуваним препаратом, не було. Незапланована смерть сталася у двох тварин (одна самка з дозою 2,6 мг/кг раз на 4 тижні, та один самець з дозою 10 мг/кг раз на 4 тижні), яких піддали евтаназії на 153 день дослідження у передсмертному стані внаслідок ентероколіту. Оскільки ентероколіт не був рідкістю в дослідницькому центрі та не розвивався у

	додаткових тварин залежно від дози, ці смерті вважалися не пов'язаними з лікуванням. Не було жодних пов'язаних із сотатерцептом клінічних ознак чи впливу на неврологічні параметри, температуру тіла, частоту дихання, артеріальний тиск, споживання їжі, ЕКГ, коагуляцію чи офтальмологічні параметри. Збільшення маси тіла, пов'язане з досліджуваним препаратом, було зменшено у самців і самок, яким вводили 10 мг/кг раз на 2 тижні, що призвело до того, що кінцева маса тіла протягом 40 тижня була на 18% і 8% нижчою, ніж у контрольній групі, відповідно. Наприкінці періоду без лікування маса тіла в групах, які отримували лікування, була порівнянною з контрольною групою або перевищувала її. Гематологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, що фармакологічно опосередковані, включали помірні зміни показників маси циркулюючих еритроцитів (збільшення HGB, HCT, RBC, RDW та зниження MCV, MCH) і помірне збільшення ретикулоцитів, яке було загалом однаковим у групах дозування та не прогресувало у тяжкості зі збільшенням тривалості дозування. Збільшення маси циркулюючих еритроцитів корелювало з мінімально низьким мієлоїдно-еритроїдним співвідношенням кісткового мозку при 10 мг/кг раз на 2 тижні. Кількість тромбоцитів мінімально знижувалася у самців лише при дозі 10 мг/кг раз на 2 тижні. Нарешті, у деяких тварин спостерігалось незначне, спорадичне, незалежне від дози мінімальне або помірне підвищення кількості моноцитів при всіх рівнях доз. Усі гематологічні зміни не вважалися негативними та продемонстрували оборотність до кінця періоду без лікування. Зміни клінічної хімії, пов'язані з досліджуваним препаратом, у самців і самок включали мінімальне або помірне підвищення BUN і креатиніну при $\geq 2,6$ мг/кг раз на 4 тижні. Ці зміни стали очевидними на 85 день дослідження і, як правило, прогресували залежно від дози до 280 дня дослідження, корелюючи з гістопатологічними змінами нирок, і вважалися несприятливими при дозі $\geq 2,6$ мг/кг раз на 4 тижні. Усі зміни клінічної хімії зникли до кінця 12-тижневого періоду без лікування. Зміни в аналізі сечі, пов'язані з досліджуваним препаратом, у самців і самок включали мінімальне підвищення рівня білка в сечі при дозі $\geq 2,6$ мг/кг раз на 4 тижні та прихованої крові в сечі при дозі ≥ 10 мг/кг раз на 4 тижні, що зазвичай починалося на 280 день дослідження та зникало до кінця періоду без лікування. Посмертні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, спостерігалися в основному в нирках, судинному сплетінні, селезінці та печінці тварин під час розтину. Сотатерцепт добре переносився в місцях підшкірної ін'єкції. Мінімальна або помірна мембранопротроліферативна гломерулопатія,
--	--

мінімальне або помірне інтерстиціальне запалення з фіброзом, мінімальне збільшення відкладення матриксу в кортикомедулярному з'єднанні та/або підвищена частота невеликих клубочкових пучків спостерігалися у самців і самок при дозі ≥ 10 мг/кг раз на 4 тижні (частота та тяжкість мембранопроліферативної гломерулопатії були більшими при 10 мг/кг раз на 2 тижні порівняно з 10 мг/кг раз на 4 тижні), і корелювала зі збільшенням маси нирок у самців 10 мг/кг раз на 2 тижні та з значними змінами нирок (збільшення, знебарвлення та/або неправильна кортикальна поверхня) при ≥ 10 мг/кг раз на 4 тижні. Зміни в нирках при дозі 2,6 мг/кг раз на 4 тижні обмежувалися мінімальним інтерстиціальним запаленням із фіброзом у 1 самця та збільшенням частоти невеликих клубочкових пучків у самців і самок. При дозі 1 мг/кг раз на 4 тижні зміни в нирках були обмежені мінімальним збільшенням відкладення матриксу в кортикомедулярному з'єднанні, яке було присутнє у 2 самок, і не були несприятливими. Подальше дослідження нирок підгрупи тварин із дозуванням 10 мг/кг раз на 2 тижні за допомогою ІГХ продемонструвало, що морфологічні зміни в клубочках і каналцях були локалізовані спільно з відкладенням IgG, імуноглобуліну М (IgM) та/або комплементу (C3), які є змінами, сумісними з імунною реакцією на сотатерцепт. Відкладення класичного імунного комплексу не було очевидним у зрізах нирок, досліджених за допомогою ТЕМ. Однак, спостерігалось надлишкове відкладення білка в мезангіальних клітинах і навколо них, що може корелювати з відкладенням IgM і IgG у яванських макак, продемонстрованим імуногістохімічним дослідженням. Накопичення сотатерцепту (частини людського IgG Fc та/або частини ActRIIA) не можна було продемонструвати за допомогою багатьох методів пошуку та ампліфікації антигену, що не дозволяє зробити висновок про локалізацію сотатерцепту з антитілами господаря в нирках. У судинному сплетінні зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, включали мононуклеарні клітини (лімфоцити та плазматичні клітини) та пінисті інфільтрати макрофагів. Невеликі вогнищеві агрегати мононуклеарних запальних клітин спостерігалися від мінімального до легкого ступеня тяжкості в судинному сплетінні більшості тварин при ≥ 1 мг/кг раз на 4 тижні. Оскільки мононуклеарні клітинні інфільтрати такого ступеня тяжкості іноді спостерігаються як фонова зміна і не були пов'язані з іншими змінами, пов'язаними із сотатерцептом, їх не вважали несприятливими. Мінімальні або помірні периваскулярні накопичення пінистих макрофагів спостерігалися з низькою частотою (від 1 до 2 тварин на групу) при дозах 2,6 та 10 мг/кг раз на 4 тижні. При дозі 10 мг/кг раз на 2 тижні частота (6/8) і тяжкість (від мінімальної до помірної) цих змін були вищими. Накопичення пінистих макрофагів було пов'язане з

мінімальним потовщенням інтими малих артерій і артеріол переважно при дозі 10 мг/кг раз на 2 тижні. Оцінка ІГХ судинного сплетення підгрупи тварин із дозуванням 10 мг/кг раз на 2 тижні підтвердила, що піністі макрофаги та судинні зміни були пов'язані з відкладенням IgG, IgM та/або C3 макак, сумісних з імунною реакцією на сотатерцепт. Подібно до нирок, ТЕМ продемонструвала надлишок білкового матеріалу в периваскулярному паттерні, який може свідчити про відкладення антитіл хазяїна, що спостерігається при ІГХ. Накопичення сотатерцепту не вдалося продемонструвати за допомогою методів багаторазового пошуку та ампліфікації антигену, що не дозволяє зробити висновок про локалізацію сотатерцепту з антитілами хазяїна в судинному сплетінні. За відсутності супутніх клінічних змін і оскільки зміни в судинному сплетінні були оборотними при всіх дозах, ці зміни не вважалися несприятливими. Тканини печінки та легенів підгрупи тварин із дозуванням 10 мг/кг раз на 2 тижні також досліджували за допомогою ІГХ, і не виявили присутності імунних комплексів.

Зменшення ваги селезінки, пов'язане з досліджуванним препаратом, при ≥ 10 мг/кг раз на 4 тижні корелювало з легким або помірним зменшенням розміру та кількості фолікулярних зародкових центрів (лімфоїдне виснаження) у селезінці при $\geq 2,6$ мг/кг раз на 4 тижні. Не було виявлено змін, пов'язаних з досліджуванним препаратом, в інших лімфоїдних тканинах.

Пов'язане з досліджуванним препаратом збільшення частоти мінімального інфільтрату мононуклеарних клітин у печінці було відмічено в усіх групах лікування. При дозі 1 мг/кг раз на 4 тижні частота цієї зміни була подібною до тієї, що іноді спостерігалася в печінці макак, які не отримували лікування у дослідницькому центрі, і не вважалася несприятливою.

Мінімальні або легкі периваскулярні або судинні базofilічні відкладення спорадично виникали в серці, аорті та/або підшлунковій залозі у 1-2 тварин при кожному рівні дози сотатерцепту. Цей результат не вважався несприятливим через низьку тяжкість і відсутність кореляційних несприятливих змін у цих тканинах.

Наприкінці 3-місячного періоду без лікування всі зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом при ≤ 10 мг/кг раз на 4 тижні зникли. При дозі 10 мг/кг раз на 2 тижні результати, пов'язані з досліджуванним препаратом, наприкінці періоду одужання обмежувалися мінімальним інтерстиціальним запаленням із фіброзом у нирках, що корелювало з неправильною кортикальною капсульною поверхнею та червоним забарвленням кори нирки, помітним у одного самця. Дещо підвищена частота невеликих клубочкових пучків спостерігалася при дозах 2,6 мг/кг і 10 мг/кг раз на 2 тижні. Відсутність мембранопроліферативної гломерулопатії при ≥ 10 мг/кг раз на 4 тижні свідчить про те,

що відбулося часткове відновлення. Оскільки невеликі клубочкові пучки виникають у деяких макак як фоновий результат, ця зміна не вважається несприятливою.

AUC і $C_{\max}$ збільшувалися пропорційно дозі після разової та повторних доз.

Після повторного введення сотатерцепт накопичувався в сироватці крові. На 37 тижні середні коефіцієнти накопичення для дозування раз на 4 тижні становили 1,55 і 1,19 для $C_{\max}$ і AUC_{0-672h} відповідно. Для дозування раз на 2 тижні коефіцієнти накопичення на 39 тижні для $C_{\max}$ і AUC_{0-336h} становили 1,66 і 1,60 відповідно.

Одна самка із дозою 10 мг/кг раз на 4 тижні була позитивною на АТП, але АТП не вплинули на кліренс сотатерцепту у цієї тварини. Жодна АТП-позитивна тварина не була виявлена під час повторного аналізу тих самих зразків за допомогою більш чутливого аналізу імуногенності (АТП).

У підсумку, застосування сотатерцепту у яванських макак протягом 9 місяців призвело до результатів, пов'язаних із досліджуваним препаратом, при всіх дозах. При $\geq 2,6$ мг/кг раз на 4 тижні протягом періоду дозування несприятливі результати, пов'язані з досліджуваним препаратом, включали клінічні хімічні зміни, що вказували на ураження нирок, інтерстиціальне запалення з фіброзом і підвищену частоту невеликих клубочкових пучків у нирках, а також лімфоїдне виснаження в селезінці. При дозах ≥ 10 мг/кг раз на 4 тижні несприятливі гістоморфологічні зміни в нирках включали мембранопрولیферативну гломерулопатію, інтерстиціальне запалення з фіброзом, збільшення відкладення матриксу в кортикомедулярному з'єднанні та/або збільшення частоти невеликих клубочкових пучків. Наприкінці 3-місячного періоду без лікування несприятливі результати були присутні в одного самця з інтерстиціальним запаленням і фіброзом нирок із дозою 10 мг/кг раз на 2 тижні. Відсутність мембранопрولیферативної гломерулопатії при ≥ 10 мг/кг раз на 4 тижні свідчить про те, що в нирках відбулося часткове відновлення. Деяко підвищена частота невеликих клубочкових пучків при дозах 2,6 мг/кг раз на 4 тижні та 10 мг/кг раз на 2 тижні не вважалася несприятливою, оскільки малі клубочкові пучки можуть бути присутніми у контрольній групі макак як фоновий результат. Усі інші результати, пов'язані з досліджуваним препаратом, зникли до кінця 3-місячного періоду без лікування.

Оскільки всі результати при дозі 1 мг/кг раз на 4 тижні мали мінімальний/легкий ступінь тяжкості, спостерігалися з низькою частотою та/або були оборотними, NOAEL для цього дослідження становила 1 мг/кг раз на 4 тижні (AUC_{0-672h} 6030 мкг*год/мл, що в 1 раз перевищує клінічну експозицію в MRHD).

Внутрішньовенне введення макакам

Сотатерцепт: дослідження для визначення можливої токсичності та токсикокінетики 4 щотижневих внутрішньовенних доз сотатерцепту, які вводили самцям і самкам яванських макак

Мета цього GLP дослідження полягала в тому, щоб визначити потенційну токсичність і ТК сотатерцепту при введенні самцям і самкам яванських макак шляхом чотирьох внутрішньовенних ін'єкцій один раз на тиждень.

Яванським макакам (5 на стать/групу) вводили 1, 10 і 30 мг/кг сотатерцепту внутрішньовенно раз на тиждень протягом 4 тижнів (загалом 4 дози). Двох макак на стать/групу утримували протягом 4-тижневого періоду без лікування.

Оцінка токсичності базувалася на смертності, клінічних спостереженнях (включаючи оцінку частоти дихання, частоти серцевих скорочень, ректальної температури тіла та часу наповнення капілярів), маси тіла, споживання їжі, електрокардіограми та офтальмологічного обстеження, а також клінічних та анатомічних (включаючи оцінку мазка кісткового мозку та репродуктивної здатності самців) оцінках патології. У зразках тварин, які отримували лікування визначали плазмові концентрації сотатерцепту та АТП.

Не було жодних незапланованих смертей чи клінічних спостережень, пов'язаних із досліджуваним препаратом, а також жодних змін у масі тіла, споживанні їжі, офтальмологічних, ЕКГ (якісна оцінка морфології), коагуляції, аналізі сечі чи посмертних (загальна маса, маса органів, гістологія) параметрів. Сотатерцепту добре переносився у місцях ін'єкції.

Гематологічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, що фармакологічно опосередковані, включали помірне підвищення показників маси циркулюючих еритроцитів (HGB, HCT і RBC) і ретикулоцитів, що відбувалося при всіх рівнях доз протягом періодів дозування та періоду без лікування.

Збільшення маси циркулюючих еритроцитів корелювало з помірно нижчим мієлоїдно-еритроїдним співвідношенням клітин кісткового мозку при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень на 57 день дослідження.

Підвищення середньої лужної фосфатази, що спостерігалось у самців при всіх дозах на 15, 29 дні дослідження та, меншою мірою, на 57 день дослідження, не мало відповідних мікроскопічних результатів, не було присутнє в інших дослідженнях сотатерцепту на макаках і не вважалося пов'язаним із досліджуваним препаратом.

Через молодий вік (від 3 до 4 років) і статеву незрілість тварин кількість сперматозоїдів у епідидимі коливалась від

	низького до нульового рівня, що призвело до дуже різноманітних даних у всіх групах доз. Таким чином, оцінка потенційних побічних реакцій сотатерцепту на кількість сперматозоїдів у епідидимі та морфологію сперматозоїдів була неможливою. При дозах 1, 10 і 30 мг/кг раз на тиждень АТП були виявлені на 29 день дослідження у 0/10, 1/10 і 1/10 тварин і на 57 день дослідження у 0/4, 2/4 і 1/4 тварин відповідно. Високі концентрації сотатерцепту можуть перешкоджати виявленню АТП в сироватці крові, тому справжня частота антитіл до сотатерцепту невідома. Концентрації сотатерцепту в плазмі крові, як виявилось, не залежали від наявності АТП. У підсумку, внутрішньовенне введення сотатерцепту в дозі до 30 мг/кг кожний тиждень протягом 4 тижнів загалом добре переносилася яванськими макаками. Зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, обмежувалися несприятливими фармакологічно опосередкованими ефектами на еритроїдні параметри при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, що корелювало зі зниженням мієлоїдно-еритроїдного співвідношення при ≥ 10 мг/кг раз на тиждень. Виходячи з цих даних, NOAEL після внутрішньовенного введення становила ≥ 30 мг/кг раз на тиждень.
3) генотоксичність: <i>in vitro</i>	Дослідження генотоксичності сотатерцепту не проводилися, оскільки ці дослідження не потрібні для біотехнологічних препаратів відповідно до ICH S6(R1): Доклінічна оцінка безпеки біотехнологічних фармацевтичних препаратів.
<i>in vivo</i> (включаючи додаткову оцінку з токсикокінетики)	
4) канцерогенність:	
довгострокові дослідження	Дослідження канцерогенності сотатерцепту не проводилися через можливість негативного впливу АТП на гризунів після тривалого введення препарату та занепокоєння щодо ниркової токсичності, що призводить до зниження виживаності тварин. У короткотривалому дослідженні на щурах середня експозиція сотатерцепту зберігалася протягом усього дослідження. Однак, частота виявлення АТП досягло 65 % до кінця 3-місячного періоду дозування, і у багатьох окремих тварин концентрація сотатерцепту була нижчою за межу кількісного визначення. У дослідженні фертильності самців, яке мало тривалість дозування, подібне до 3-місячного дослідження ТК, АТП були виявлені із загальним рівнем виникнення 57,3 %. Очікується, що після більш тривалого дозування показники АТП у гризунів зростуть і негативно вплинуть на вплив сотатерцепту та інтерпретацію даних довгострокових досліджень на гризунах. Крім того, у 3-місячному дослідженні на щурах, ниркова токсичність, опосередкована сотатерцептом (мембранопроліферативний гломерулонефрит), ефект, який на сьогоднішній день не перенесено в клініці, спостерігався у щурів при дозах $\geq 0,3$ мг/кг раз на 1 тиждень, і був пов'язаний зі збільшенням
короткострокові дослідження або дослідження середньої тривалості	
додаткові дослідження	

біомаркерів уражень сечових шляхів при дозі 30 мг/кг раз на 1 тиждень. Очікується, що прогресування цієї токсичності, особливо в поєднанні з розвитком хронічної прогресуючої нефропатії, яка є поширеною у старіючих щурів, зменшить виживаність тварин і доцільність довгострокових досліджень на щурах. Таким чином, відповідно до ICH S6(R1): Доклінічна оцінка безпеки біотехнологічних фармацевтичних препаратів, канцерогенний потенціал сотатерцепту було оцінено в оцінці ризику на основі вагомості доказів (запит на відмову від досліджень канцерогенності). Оцінка ризику на основі вагомості доказів і запит на скасування вимог щодо досліджень канцерогенності раніше були подані до Виконавчого комітету з оцінки канцерогенності Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США. Комітет підтвердив, що дослідження канцерогенності сотатерцепту не потрібні. Так само ЕМА неофіційно погодилася, що дослідження канцерогенності не потрібні. Ключові міркування, представлені в оцінці ризику на основі вагомості доказів, підсумовані нижче.

Сотатерцепт є біологічним агентом та інгібітором стимулюючих ріст цитокінів, які є членами суперсімейства TGF- β . Основними лігандами сотатерцепту є активін А, активін В, GDF-11, GDF-8 і BMP-10. Ці ліганди передають сигнал через набір рецепторів, що перекривається, і з'єднані з тим самим набором білків Smad. Незважаючи на такий збіг, функціональна надмірність між членами суперсімейства трансформуючого фактора росту (TGF) обмежена різними моделями просторово-часової експресії лігандів і рецепторів, відмінностями в динаміці сигналізації та регуляторними білками, які модулюють відповіді на різних етапах.

У моделях легеневої гіпертензії на тваринах сотатерцепт мав антипроліферативну дію на гладком'язові клітини судин. У нормальних, здорових тварин лікування сотатерцептом не призвело до проліферативних або передпухлинних змін у будь-яких видів, досліджених у рамках комплексної програми доклінічної токсикології. Як біологічний терапевтичний препарат, сотатерцепт не становить ризику генотоксичності.

Активіни можуть модулювати гормональну передачу сигналів, головним чином через стимуляцію вивільнення фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) гіпофізом. Підвищені передача сигналів ФСГ та/або концентрація в плазмі пов'язані з підвищеною частотою раку молочної залози та епітелію яєчників. Таким чином, пов'язане із сотатерцептом зниження ФСГ може бути корисним у контексті цих типів пухлин. Участь GDF-11, GDF-8 і BMP-10 у гормональній модуляції не описана. У самців і самок щурів, які отримували сотатерцепт, зміни в структурі та/або функції репродуктивної тканини, ймовірно, спричинені

інгібуванням активіну, а не гормональною модуляцією. У самців щурів зміни в яєчках і придатках яєчок, а також вплив на фертильність самців вважалися вторинними щодо обструкції відтоку на рівні виносних проток і не узгоджувалися з потенційним прямим впливом на статеві гормони. У самок щурів збільшення втрат до і після імплантації може бути пов'язане з механізмом зниження активінів, які мають вирішальне значення для децидуалізації ендометрія та підготовки ендометрія до імплантації. У дослідженнях сотатерцепту на молодих щурах дуже незначні зміни лютеїнізуючого гормону (ЛГ), ФСГ та/або естрадіолу не вважалися токсикологічно значущими, а підвищення концентрації еритропоєтину в окремих тварин було незначним і з невизначеним зв'язком з лікуванням. Хоча макаки в доклінічних дослідженнях не були статевозрілими, введення сотатерцепту протягом 9 місяців не викликало змін, пов'язаних із досліджуванним препаратом, у репродуктивних органах самців і самок. Підсумовуючи, наукова література та доклінічні дані свідчать про те, що зниження лігандів сотатерцепту, засноване на механізмі, навряд чи модулюватиме гормональну передачу сигналів у проканцерогенний спосіб.

Активін А відіграє важливу роль у регуляції імунних відповідей і визнаний важливим цитокином, що регулює запалення та імунну систему. Активін А та його антагоніст фолістатин підвищуються під час системного запалення, і більшість імунних клітин можуть виробляти та реагувати на активін А. Відповідь відрізняється між типами клітин і залежить від дозрівання клітин, статусу активації клітин, а також від просторового та часового контексту імунної відповіді. Активін А може регулювати або про-, або антитизапальну відповідь у макрофагах, залежно від їх попереднього статусу активації. Літературні дані також свідчать про те, що активін А може стимулювати вироблення антитіл В-клітинами і може впливати на розвиток регуляторних Т-клітин. На відміну від цього, потенційний вплив GDF-8 і GDF-11 на імунну функцію описано недостатньо. Незважаючи на потенційну роль передачі сигналів активіну в регуляції імунної функції, немає остаточних доказів того, що сотатерцепт впливає на імунну функцію. Одне дослідження сотатерцепту на макаках було припинено достроково через наявність інфекції плазмодія у багатьох тварин і передчасну смерть 1 тварини через фульмінантну малярію. Плазмодій був присутній до початку дослідження, але його захворюваність і тяжкість збільшилися протягом 9-тижневого періоду дозування. Хоча можливо, що опосередковані сотатерцептом зміни в імунній функції підвищили сприйнятливості цих тварин до інфекції, добре відомо, що препарати, що стимулюють еритропоєз, можуть посилити плазмодієву інфекцію шляхом збільшення

популяції потенційних клітин-господарів. Таким чином, ймовірно, що опосередковане сотатерцептом збільшення еритроцитів і ретикулоцитів, а не зміни імунної функції, підвищило сприйнятливість оброблених тварин до інфекції плазмодія. У завершених доклінічних дослідженнях сотатерцепту відмічалася мінімальне або помірне виснаження лімфоїдів у тимусі макак при дозах ≥ 10 мг/кг раз на 2 тижні під час 27-тижневого дослідження і в селезінці при дозах $\geq 2,6$ мг/кг раз на 4 тижні під час 9-місячного дослідження. Однак у макак і дорослих щурів при всіх випробуваних дозах не було виявлено жодних ознак дегенерації або некрозу в тимусі чи селезінці, жодних небажаних проявів в інших лімфоїдних тканинах і жодних значущих змін у циркулюючих лейкоцитах. Лімфоїдні зміни у молодих щурів, як правило, обмежувалися мінімальним або помірним зменшенням клітинності в маргінальній зоні білої пульпи та/або мінімальним або помірним збільшенням клітинності в червоній пульпі селезінки. У базовому дослідженні молодих щурів не було жодних змін, пов'язаних із досліджуваним препаратом, в аналізі TDAR, а дані імунофенотипування не вказували на пригнічення імунітету. Сукупність доклінічних даних свідчить про те, що сотатерцепт не має токсикологічно значущих імуномодуючих ефектів, які могли б вплинути на його канцерогенний потенціал.

Наукова література значною мірою непереконлива щодо ролі лігандів сотатерцепту та їх різноманітних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, оскільки вони стосуються біології пухлини. Показано, що активін A і GDF-11 індукують апоптоз або пригнічення росту в деяких контекстах і посилення проліферації в інших. TFG- β , який має структурну подібність з активіном A і має спільні частини шляху передачі сигналу, відіграє подвійну роль у канцерогенезі. Враховуючи профіль зв'язування плейотропного ліганду сотатерцепту та суперечливу наукову літературу, важко зробити значущі висновки щодо потенціалу цього рецептора-приманки негативно чи позитивно впливати на ріст пухлини. Подібним чином, ефекти активіну A в імунології раку важко передбачити, оскільки вони також залежать від типу клітини/пухлини, а також від контексту імунної відповіді. Потенційний зв'язок між рецепторами ліганду сотатерцепту (ACVR2A, ACVR2B, активін-рецептор подібний (ALK)1, ALK4, ALK5 і ALK7) і раком людини оцінювали за допомогою баз даних генетики людини (Online Mendelian Inheritance in Man [www.omim.org], портал Open Targets Genetics [https://genetics.opentargets.org]) і баз даних генів раку людини (COSMIC [https://cancer.sanger.ac.uk] і Intogen [https://www.intogen.org]). Пошук у базі даних проводився протягом серпня та вересня 2022 року. Не було виявлено

	прямого зв'язку цих рецепторів із потенційними канцерогенними проблемами для людини. Разом доклінічний профіль сотатерцепту та літературні дані вказують на те, що ця біологічна молекула не має генотоксичного потенціалу, має антипроліферативну та антифіброзну дію у тваринних моделях ЛАГ, не впливає негативно на гормони, не викликає імунотоксичності, гіперплазії чи розвитку пухлини у тварин, і що рецептори, залучені до зв'язування ліганду сотатерцепту, не пов'язані безпосередньо з канцерогенезом у людей. Виходячи з сукупності цих доказів, вважається, що сотатерцепт має низький канцерогенний потенціал.
5) репродуктивна токсичність та токсичний вплив на розвиток потомства:	
вплив на фертильність і ранній ембріональний розвиток	Сотатерцепт: GLP оцінка фертильності самців, яким вводили сотатерцепт один раз на тиждень шляхом підшкірної ін'єкції щурам лінії Спрег-Доулі з 13-тижневим відновленням Мета цього GLP дослідження полягала в тому, щоб перевірити потенційний вплив на фертильність самців у результаті лікування сотатерцептом раз на тиждень щурів самців Crl:CD (стандартне відхилення (CB)) перед спільним проживанням, під час спаровування з самками щурів, які не отримували лікування і до припинення дослідження. Для оцінки оборотності будь-яких потенційних ефектів, які спостерігалися під час лікування, було включено період без лікування приблизно 13 тижнів. Тридцяти самцям щурів/групу вводили носій або сотатерцепт у дозах 0,3, 3 або 30 мг/кг підшкірно раз на тиждень протягом 10 тижнів до спільного проживання, під час спільного проживання та продовжували кожні 1 тиждень протягом 3 тижнів після спільного проживання (загалом 13 доз). До 15 самців/групу залишали на 13-тижневий період без лікування. Щонайменше 45 самок щурів, які не отримували лікування, на групу були випадковим чином розподілені в чотири групи доз для спаровування з самцями, які отримували лікування. Під час дослідження самкам щурів не вводили носій або сотатерцепт. Для всіх щурів оцінювали наступні параметри та кінцеві точки: життєздатність, клінічні ознаки, масу тіла, збільшення маси тіла, споживання їжі, спарювання та фертильність, а також макроскопічні спостереження. Самців щурів додатково оцінювали на рухливість сперматозоїдів, концентрацію сперматозоїдів, масу репродуктивних органів і гістопатологію, а самок щурів, які не отримували лікування додатково оцінювали на естральний цикл і вміст яєчників і матки. Експозиція сотатерцепту у самців щурів була оцінена на основі даних ТК при 0,3, 3 та 30 мг/кг раз на тиждень. Відповідь на АТП до

сотатерцепту визначали в контрольній групі і у групі самців щурів, які отримували лікування.

Не було жодних незапланованих смертей, пов'язаних із сотатерцептом. З 3 незапланованих смертей 1 самець з контрольної групи був знайдений мертвим на 64 день дослідження, один самець із дозуванням 30 мг/кг раз на тиждень був знайдений мертвим протягом періоду без лікування (день дослідження 148) і не мав інших ознак токсичності, а один самець із дозуванням 30 мг/кг раз на тиждень був евтаназований на 36 день дослідження через небажані клінічні ознаки, які вважалися не пов'язаними з лікуванням.

Не було виявлено жодних клінічних ознак або впливу на споживання їжі, пов'язаних із досліджуваним препаратом.

Зміни маси тіла, пов'язані з досліджуваним препаратом, обмежувалися тимчасовим зниженням середнього приросту маси тіла при всіх рівнях доз протягом 1–8 днів дослідження (-12, -14 і -18% від контрольної групи при 0,3, 3 і 30 мг/кг раз на тиждень відповідно).

Індекс фертильності та індекс вагітності були знижені при дозі 30 мг/кг раз на тиждень порівняно з контрольною групою (82,8% проти 96,6% у контрольній групі для індексу фертильності та індексу вагітності) наприкінці періоду дозування. Не було виявлено жодних впливів досліджуваного препарату на фертильність або спаровування протягом періоду без лікування при будь-якому рівні дози.

Макроскопічні зміни, пов'язані з досліджуваним препаратом, були обмежені яєчками та придатками яєчка та включали однобічний або двосторонній невеликий розмір або аномальну консистенцію при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень на кінцевих аутопсіях і в період без лікування. Ці зміни корелювали з дегенерацією/атрофією яєчка або зниженням клітинності просвіту сперматозоїдів у придатку яєчка.

Не було жодних змін маси органів, пов'язаних із сотатерцептом, ані в кінцевий період, ані в період без лікування.

Під час термінального розтину спектр мікроскопічних змін у виносних протоках при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень збільшився за частотою та тяжкістю залежно від дози, та включав від мінімальної до вираженої гранульому сперматозоїдів, від мінімального до помірного стазу сперми, мінімальний фіброз, від мінімальної до помірної мінералізацію та/або від мінімальної до помірної змішану клітинну інфільтрацію.

Ці зміни часто були односторонніми, іноді двосторонніми, та варіювалися від невеликих ділянок вогнищевої мінералізації та/або фіброзу в еферентних протоках до більших ділянок зі стазом сперматозоїдів і навколишнім змішаним інфільтратом. У кількох тварин були присутні гранульоми сперми з ознаками оклюзії виносних проток. Зміни в сім'яних каналцях у щурів при дозі $\geq 0,3$ мг/кг раз на

	тиждень, як правило, асоціювалися зі змінами еферентних проток, і включали підвищену частоту та тяжкість односторонньої або двосторонньої дегенерації/атрофії сім'яних каналців, причому іноді тварини при дозі 30 мг/кг раз на тиждень мали додаткові зміни, включаючи помірне розширення каналців, розширення/стаз сперматозоїдів у сітці яєчка, та/або гранульома сперми. У цих тварин у придатку яєчка також спостерігалось одностороннє або двостороннє зниження клітинності (зниження просвіту сперматозоїдів) від помірного до сильного. Вплив на яєчка та епідидим вважався вторинним по відношенню до обструкції відтоку на рівні виносних проток. Під час розтину в період без лікування при $\geq 0,3$ мг/кг один раз на тиждень мікроскопічні зміни в еферентних протоках включали помірну гранульому сперми, мінімальний стаз сперми, мінімальний фіброз, мінімальну мінералізацію та/або мінімальну або помірну змішану клітинну інфільтрацію. Ці зміни часто були односторонніми, іноді двосторонніми та варіювалися від невеликих ділянок вогнищевої мінералізації та/або фіброзу в еферентних протоках до більших ділянок із стазом сперматозоїдів і оточуючим змішаним інфільтратом або повністю сформованою гранульома сперми. Змішані запальні клітинні інфільтрати також були відзначені в жировій клітковині, прилеглій до придатка яєчка, у кількох тварин. Ці зміни залежали від дози і загалом були подібні до тих, що спостерігалися під час кінцевого розтину. У зв'язку з ефектом еферентної протоки у щурів іноді спостерігалася одностороння або двостороння дегенерація/атрофія сім'яних каналців з/без розширення каналців, гранульоми сперматозоїдів, стазу сперматозоїдів та/або мінералізації та зниження клітинності сперматозоїдів епідидиму. Незважаючи на те, що не спостерігалось помітного збільшення захворюваності порівняно з контрольною групою під час розтину в період без лікування (оскільки один щур з контрольної групи мав подібні односторонні зміни в яєчках і придатках яєчок), зміни, що спостерігалися в репродуктивному тракті самця при всіх дозах, вважалися пов'язаними із сотатерцептом і несприятливими через підвищену частоту змін виносної протоки з вторинними ефектами в яєчках і придатках яєчка як при кінцевому розтині, так і при розтині в період без лікування. Мікроскопічні особливості, зазначені в еферентних протоках у цьому дослідженні та в яєчках у 3-місячному дослідженні токсичності, низька частота цих змін і переважно односторонній прояв цих ефектів узгоджуються зі зміненою динамікою рідини, яка виникає після закупорки еферентних проток. На відміну від цього, прямий токсичний вплив на яєчка, як правило, проявляється двосторонньо.
--	--

Секреція рідини клітинами Сертолі в яєчках необхідна для підтримки життєздатності сперматозоїдів і забезпечення транспорту сперматозоїдів у просвіт каналців і еферентних проток у щурів, які реабсорбують майже 90% рідини сітківки яєчок. Ефекти, які спостерігаються в репродуктивному тракті самців щурів, які отримували сотатерцепт, узгоджуються з обструкцією виносних проток та/або блокуванням реабсорбції рідини, шкідливим підвищенням зворотного тиску в просвіті сім'яних каналців у яєчках і вторинною атрофією яєчок, пов'язаною з тиском.

Через анатомічні відмінності в еферентних протоках щурів і людей ризик токсичності яєчок внаслідок закупорки виносних проток у людей є низьким. На відміну від довгих виносних протоків щурів, які зливаються в одну протоку, що входить у придаток яєчка, у людини виносні протоки значно коротші, не зливаються в одну протоку та входять у придаток яєчка в кількох місцях. Таким чином, у людей відтік рідини відбувається, навіть якщо закупорюються кілька еферентних проток або пригнічується реабсорбція рідини.

Щільність сперматозоїдів у хвостовому відділі епідидиму була знижена в групі дозування 30 мг/кг раз на тиждень наприкінці періоду введення дози порівняно з контрольною групою (-27% від контрольної групи). Не було жодних змін, пов'язаних із сотатерцептом, у параметрах сперми (рухливість сперматозоїдів сім'явивідної протоки або щільність сперматозоїдів у хвостовому відділі епідидиму) наприкінці періоду без лікування при будь-якому рівні дози. У підсумку, наявні дані та літературна інформація переконливо свідчать про те, що токсичність яєчок щурів була результатом змін у динаміці рідини внаслідок обструкції виносної протоки.

Подібні ефекти на яєчка навряд чи виникнуть у людей через анатомічні відмінності в структурі виносних проток у щурів і людей.

Не було виявлено жодного впливу, пов'язаного з досліджуваним препаратом, на параметри яєчників або матки у самок, які не отримували лікування, і самців, які отримували лікування. АТП були виявлені у 0 з 30 тварин з контрольної групи, 16 з 30 (53,3 %) тварин при 0,3 мг/кг раз на тиждень, 17 з 30 (56,7 %) тварин при 3 мг/кг раз на тиждень і 18 з 29 (62,1 %) тварин при 30 мг/кг раз на тиждень, що становить загальну частоту 57,3 % (51 з 89).

На завершення, підшкірне введення сотатерцепту самцям щурів лінії Спрег-Доулі один раз на тиждень протягом 10 тижнів до спільного проживання, під час спільного проживання та протягом дня перед евтаназією в дозах 0,3, 3 та 30 мг/кг раз на тиждень призвело до змін, пов'язаних із досліджуваним препаратом, на всіх рівнях доз. Тимчасове зниження збільшення маси тіла на початку періоду введення дози на всіх рівнях доз не вважалося несприятливим. При

дозі 30 мг/кг раз на тиждень зниження щільності сперматозоїдів у хвостовій частині епідидиму, індексу фертильності та індексу вагітності, що відбулося наприкінці періоду дозування, не спостерігалось наприкінці періоду без лікування. Дозозалежні мікроскопічні результати були присутні у виносних протоках із вторинними ефектами, присутніми в яєчках і придатках яєчок у всіх дозах у кінцевий період часу та період без лікування, і вважалися несприятливими (NOAEL для змін виносних проток/яєчок становила <0,3 мг/кг раз на тиждень).

Не було жодного супутнього репродуктивного функціонального дефіциту до результатів у виносних протоках і яєчках при ≤ 3 мг/кг раз на тиждень. У результаті несприятливими вважалися лише результати репродуктивної функції при дозі 30 мг/кг раз на тиждень. Таким чином, репродуктивна NOAEL становила 3 мг/кг раз на тиждень, що відповідає розрахунковим $C_{\max}$ і AUC_{0-168h} 20,3 мкг/мл і 2960 мкг*год/мл відповідно (у 2 рази вище клінічної експозиції при MRHD).

Сотатерцепт: дослідження фертильності та раннього ембріонального розвитку на самках щурів, яким вводили сотатерцепт підшкірно

Двадцять п'яти самкам щурів лінії Спрег-Доулі у кожній групі вводили носій або сотатерцепт у дозах 5, 15 або 50 мг/кг підшкірно раз на тиждень протягом 2 тижнів до спарювання та продовжували до 7 дня вагітності (загалом до 5 доз). Додатково від 3 (контрольна група до 5 (отримували лікування досліджуваним препаратом) самок/групу використовували лише для визначення ТК, і їм вводили дози згідно з тим самим графіком, що й тваринам основного дослідження.

Усіх самок, що вижили та було підтверджено спаровування, піддавали евтаназії та розтину на 13 день вагітності. Самців, які не отримували лікування розподіляли в кожну групу лікування (25 самців/групу) і використовували лише для цілей спаровування.

Були оцінені наступні параметри та кінцеві точки: життєздатність, клінічні ознаки, маса тіла, приріст маси тіла, споживання їжі, спаровування та плідність, маса органів, макроскопічні та мікроскопічні спостереження (обмежені яєчниками та маткою з шийкою матки з контрольної групи та групи 50 мг/кг раз на тиждень у самок), естральний цикл, вміст яєчників та матки. Аналіз ТК та аналіз імуногенності (АТП) проводили в контрольній групі та групі, яка отримувала лікування.

Було 2 випадки незапланованої смерті, пов'язані з досліджуваним препаратом, при дозі 50 мг/кг раз на тиждень. Цих тварин було евтаназовано на 5 або 8 дні вагітності через помірний або сильний набряк задніх кінцівок, який значно

погіршував рухливість. Макроскопічні зміни у цих тварин включали збільшені та червоні надниркові залози та помірний або сильний набряк задніх кінцівок.

Небажані зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, спостерігалися при дозі ≥ 15 мг/кг раз на тиждень. Протягом періоду вагітності у п'яти тварин із дозуванням 50 мг/кг раз на тиждень спостерігався набряк однієї чи обох задніх кінцівок та/або порушення рухливості, а двох тварин із цими змінами було евтаназовано раніше. Під час передпологового періоду збільшення тривалості естрального циклу спостерігалось при дозі 50 мг/кг раз на тиждень (6,7 днів проти 4,6 днів у контрольній групі), що корелювало з меншою середньою кількістю циклів (1,7 проти 2,4 у контрольній групі). Індeksi фертильності та плідності були нижчими при дозах 15 мг/кг раз на тиждень (80 % і 83 %, відповідно) і 50 мг/кг раз на тиждень (36 % і 43 %, відповідно) порівняно з одночасними (96 % і 100 %) і історичними даними контролю. При 50 мг/кг раз на тиждень спостерігався нижчий індекс спаровування (84 %) порівняно з контрольною групою (96 %) та історичним діапазоном контролю для цієї лабораторії.

При дозі 15 і 50 мг/кг раз на тиждень під час огляду матки на 13 день вагітності спостерігалися нижчі показники вагітності, збільшення втрат до і після імплантації (включаючи збільшення кількості повністю резорбованих послідів) і зменшення розміру посліду. Збільшення та/або зміна кольору надниркових залоз при дозах 15 і 50 мг/кг раз на тиждень спостерігалися макроскопічно (мікроскопічна оцінка не проведені), і вважалися несприятливими на основі аналогічних результатів інших досліджень на щурах. Нижча маса вагітної матки з шийкою матки (абсолютна та відносна до маси тіла) спостерігалася при дозах 15 і 50 мг/кг раз на тиждень (порівняно з контрольною групою), і була пов'язана зі зменшенням кількості життєздатних ембріонів і збільшенням втрат після імплантації. Мікроскопічне дослідження яєчників і маток у самок з дозою 50 мг/кг раз на тиждень показало відсутність змін у цих органах (за винятком відсутності місць імплантації в невагітних матках). Наступні зміни вважалися результатом застосування сотатерцепту, але не несприятливими. Збільшення середньої маси тіла (до 7,7 %) і середнього приросту маси тіла (до 2-кратних значень контролів) відбулося під час періоду перед спаровуванням при ≥ 15 мг/кг раз на тиждень, і корелювало зі збільшенням споживання їжі. Зменшення середньої кількості місць імплантації (14,5 проти 16,3 у контрольній групі) та середньої кількості життєздатних ембріонів спостерігалось при дозі 5 мг/кг раз на тиждень (13,7 проти 15,6 на тварину в контрольній групі). Однак значення для кожного показника було в межах історичного контрольного діапазону для лабораторії. Дещо нижча маса вагітної матки з

	шийкою матки (абсолютна та відносна до маси тіла) у дозі 5 мг/кг раз на тиждень пов'язана зі зменшенням кількості життєздатних ембріонів. Антитіла до препарату були виявлені в 1 тварини середньої дози та 1 тварини високої дози в групі ТК. Утворення антитіл могло знизити експозицію у цих тварин, але не мало помітного впливу на загальні профілі сироватки для груп дозування. Загальна частота утворення антитіл до препарату у групах доз 0, 5, 15 і 50 мг/кг раз на тиждень становила 0/28, 14/30, 12/30 і 6/30, відповідно. На основі ранньої евтаназії 2 самок при дозі 50 мг/кг раз на тиждень, NOAEL для материнської токсичності становила 15 мг/кг раз на тиждень, що відповідає AUC_{0-168h} 12300 мкг*год/мл. На підставі побічних ефектів, які спостерігалися при дозах 15 і 50 мг/кг раз на тиждень, NOAEL для фертильності самок та раннього ембріонального розвитку становила 5 мг/кг раз на тиждень, що відповідає AUC_{0-168h} 2735 мкг*год/мл (у 2 рази більше клінічної експозиції при MRHD).
ембріотоксичність	Сотатерцепт: дослідження підшкірної токсичності сотатерцепту для розвитку у щурів, включаючи сателітну токсикокінетичну оцінку Метою цього GLP дослідження було виявити несприятливий вплив сотатерцепту на ймовірно вагітних самок щурів лінії Спрег-Доулі та розвиток ембріона та плоду. Двадцять вісім імовірно вагітних самок щурів/групу отримували сотатерцепт у дозах 5, 15 або 50 мг/кг або тільки носій підшкірно на 6 і 13 дні вагітності (загалом 2 дози). З цих тварин шість самок щурів/групу були призначені лише для оцінки ТК. Усіх самок щурів, які вижили, піддавали евтаназії та розтину на 21 день вагітності. Були оцінені наступні параметри та кінцеві точки: життєздатність, клінічні спостереження, маса тіла та зміни маси тіла, споживання їжі, спостереження кесаревого розтину, маса матки при вагітності, загальні зовнішні зміни плода, м'яких тканин і скелета, маса тіла плода та маса тіла матері в термінальній стадії. Аналіз ТК та імуногенності (АТП) проводили на контрольній групі і групі, яка отримувала лікування. Усі щури основного дослідження вижили до запланованої евтаназії. На 15 день вагітності (протягом періоду відбору зразків ТК) у одної тварини, яка отримувала 50 мг/кг, стався викидень, і її було згодом евтаназовано. При розтині всі тканини цієї тварини були нормальними. Через одиничність випадку цей викидень не вважався пов'язаним із досліджуваним препаратом. Не було жодних клінічних спостережень або загальних результатів, пов'язаних із досліджуваним препаратом.

Не було жодних пов'язаних із сотатерцептом змін маси тіла або збільшення маси тіла після першої та другої дози (день вагітності 6–7 та день вагітності 13–14) при будь-якому рівні дози. Маса тіла, збільшення маси тіла та маса вагітної матки не змінювалися в групах доз 5 та 15 мг/кг.

Зменшення приросту маси тіла (порівняно з контрольною групою) у групі дозування 50 мг/кг від дня вагітності 18 до 21 корелювало з несприятливим мінімальним зниженням споживання їжі. Зменшення приросту маси тіла при дозі 50 мг/кг вважалося вторинним по відношенню до пов'язаного з досліджуванним препаратом зниження ваги вагітної матки при цьому рівні дози. Після корекції маси вагітної матки, маса тіла матері на 21 день вагітності і кумулятивний приріст маси тіла були порівнянними між групами доз.

Спостерігалось пов'язане з досліджуванним препаратом збільшення відсотка постімплантаційних втрат при 50 мг/кг (27,9 %) порівняно з групою носія (8,8 %). Ця зміна відображала збільшення середньої кількості пізніх резорбцій на послід (2,6 пізніх резорбцій на послід порівняно з 0,0 у контрольній групі), загальне збільшення середньої кількості резорбцій на послід (3,6 резорбцій на послід порівняно з 1,2 у контрольній групі), три мертвих плода (з трьох послідів) і загальну втрату посліду в іншій матері в групі дозування 50 мг/кг. Відображаючи ці збільшення постімплантаційних втрат, середні значення для розміру посліду та живих плодів були значно знижені на рівні 50 мг/кг порівняно зі значеннями групи носія.

Дозозалежне зниження маси тіла плода відбулося при дозі ≥ 5 мг/кг (комбіновані значення для обох статей на 9 %, 15 % та 22 % менше, ніж у контрольній групі). Однак зниження маси плода при 5 мг/кг було незначним, а середнє значення знаходилося в межах історичного контрольного діапазону і, отже, не вважалося несприятливим ефектом сотатерцепту.

Відбиваючи меншу масу тіла плода, яка спостерігалася в групах доз 15 і 50 мг/кг, у цих групах доз спостерігалася затримка осифікації грудних та поперекових хребців, плюсневих кісток задніх кінцівок та/або фаланг задніх кінцівок. Крім того, у групі доз 50 мг/кг спостерігалися значні зміни у кількості ділянок окостеніння, що відображають збільшення частоти декількох пов'язаних варіацій (зайві грудні ребра з супутнім значним збільшенням та зменшенням кількості грудних та поперекових хребців відповідно).

Жодних макроскопічних змін зовнішніх, м'яких тканин або скелетних змін плоду (пороки розвитку або варіації) не було спричинено дозами сотатерцепту до 50 мг/кг.

Концентрації сотатерцепту у сироватці підтримувалися дозозалежним чином протягом критичного періоду органогенезу (6–16 день вагітності) після двох щотижневих

ін'єкцій. На 13 день вагітності концентрації сотатерцепту до введення дози становили не менше 20 % $C_{\max}$ 6 дня вагітності при кожному рівні дози.

Після другої дози на 13 день вагітності рівні сотатерцепту досягли рівня плато до 16 дня вагітності, а потім швидко знизилися до 18 дня вагітності, що призвело до зниження $AUC_{0-168\text{год}}$ групи доз 5 і 15 мг/кг. Цілком ймовірно, що АТП сприяли швидкому виведенню препарату після другої дози.

Антитіла до сотатерцепту були виявлені у 64 % щурів, які отримували лікування основного дослідження та 83 % сателітних щурів ТК, які отримували лікування. Вироблення антитіл до сотатерцепту після другої ін'єкції не призвело до значного зниження рівня сотатерцепту в сироватці крові до 18 дня вагітності.

На основі цих даних материнська NOAEL для сотатерцепту становила 50 мг/кг, що відповідає $AUC_{0-168\text{h}}$ 19 885 мкг*год/мл. При дозі ≥ 15 мг/кг спостерігалось зниження маси плода та затримка осифікації скелета. При застосуванні лише 50 мг/кг спостерігалось збільшення пізньої фетальної летальності, пов'язане із загальним збільшенням постімплантаційних втрат і зменшенням розміру живого посліду, а також збільшенням частоти надлишкових ребер із відповідним збільшенням і зменшенням грудних і поперекових хребців відповідно. Таким чином, виходячи з несприятливої величини зниження ваги плода при дозі 15 мг/кг, NOAEL для розвитку становила 5 мг/кг, що відповідає $AUC_{0-168\text{h}}$ 2642 мкг*год/мл (у 2 рази більше клінічної експозиції при MRHD).

Сотатерцепт: дослідження токсичності сотатерцепту на розвиток кролів при підшкірному введенні, включаючи сателітну токсикокінетичну оцінку

Мета цього дослідження полягала в тому, щоб надати інформацію для вибору доз для використання в основному дослідженні токсичності (ембріо-фетальної токсичності та тератогенного потенціалу) для розвитку сотатерцепту, який вводили підшкірно імовірно вагітним новозеландським білим кролицям.

П'ятьом імовірно вагітним новозеландським білим кролицям/групу вводили сотатерцепт у дозах 5, 15 або 50 мг/кг або лише носій підшкірно на 7 і 14 день вагітності (загалом 2 дози). Додаткові 3 кролиці/групу в групах 5, 15 та 50 мг/кг отримували аналогічну дозу та були призначені для оцінки ТК. Усі тварини, що вижили, були піддані евтаназії та розтину на 29 день вагітності.

Були оцінені наступні параметри та кінцеві точки: життєздатність, клінічні спостереження, маса тіла, зміни маси тіла, споживання їжі, гематологічні параметри, спостереження розтину, кесарів розтин і спостереження за послідом, маса тіла плода, стать плоду та макроскопічні

зовнішні зміни плода. Аналізи ТК та імуногенності (АТП) проводили на групах, які отримували лікування, і об'єднану концентрацію фетальної крові визначали у дитинчат тварин, які отримували лікування.

Дві кролиці в групі дозування 50 мг/кг, які були призначені для основного дослідження, були гуманно етаназовані на 23 день вагітності через несприятливі клінічні ознаки, які зазвичай включали мізерний кал, червону речовину в клітці, недоглянуту шерсть та/або холодну на дотик шкіру. Додаткові зміни перед етаназією включали втрату маси тіла та зменшення споживання їжі. Викидні (тварини згодом були етаназовані) сталися в однієї кролиці в групі дозування 5 мг/кг і у двох кролиць у групі дозування 50 мг/кг, кожна з яких було віднесено до частини дослідження ТК. Клінічні прояви кролиць з викиднями були подібні до основних досліджуваних тварин, які були етаназовані. Вважалося, що ці смертні випадки та викидні пов'язані з сотатерцептом.

У тих тварин, які вижили, несприятливі клінічні спостереження, пов'язані з досліджуваним препаратом, включали червону речовину в клітці у трьох із п'яти кролиць у групі дозування 50 мг/кг та червоні знебарвлені та/або набряклі повіки у трьох і двох кролиць у групах дозування 15 та 50 мг/кг відповідно.

Під час розтину рідина була виявлена в перикардіальній сумці серця у однієї кролиці у групі 5 мг/кг, та у однієї кролиці у групі 15 мг/кг, і у трьох кролиць у групі 50 мг/кг.

Втрата маси тіла відбулася при дозі 15 мг/кг протягом усього періоду після введення дози (з 15 до 29 день вагітності), а приріст маси тіла був зменшений у групі дозування 50 мг/кг протягом цього ж періоду. Загальне зниження приросту маси тіла у групі 50 мг/кг відображає втрату маси тіла від 15 до 20 дня вагітності і пригнічений приріст маси тіла від 25 до 29 день вагітності порівняно з контрольною групою. Загалом приріст маси тіла був знижений у групах доз 15 і 50 мг/кг для комбінованих доз та періодів після введення дози (з 7 до 29 день вагітності) порівняно з контрольною групою.

Постімплантаційні втрати (тобто рання і пізня резорбції та відсоток постімплантаційних втрат) були збільшені при 15 і 50 мг/кг порівняно з контрольною групою. Одна самка в групі дозування 50 мг/кг мала послід усіх резорбованих концептусов. Відображаючи ці збільшення постімплантаційних втрат, середні показники розміру посліду та живих плодів були зменшені, а відсоток резорбованих концептусів на послід зріс у групах доз 15 та 50 мг/кг порівняно з контрольною групою.

Маса тіла плода (самця, самки та комбінована) була знижена при ≥ 5 мг/кг (комбінована маса тіла плода була на 14 %, 35 % і 23 % меншою, ніж у контрольній групі в групах 5, 15 і 50 мг/кг відповідно).

Не було жодних інших параметрів посліду, а також жодних змін кесаревого розтину, споживання їжі чи гематологічних змін при дозах сотатерцепту до 50 мг/кг. Середні показники посліду для жовтих тїл, імплантацій і відсотка живих ембріонів чоловічої статі були порівнянними серед чотирьох груп дозування. У тварин, які вижили до планової евтаназії, мертвих плодів не було. Усі плаценти виглядали нормальними.

Концентрації сотатерцепту в сироватці крові підтримувалися залежно від дози у вагітних кролиць протягом 2 тижнів поспіль. Середнє співвідношення AUC (тиждень 2/тиждень 1) становило 1,01, що вказує на відсутність накопичення при дозуванні один раз на тиждень.

Сотатерцепт було виявлено в об'єднаних зразках фетальної сироватки при кожному рівні дози на 29 день вагітності, що свідчить про те, що до кінця гестації сотатерцепт може долати плацентарний бар'єр. Концентрації у плода становили від 1 % до 39 % концентрацій у сироватці крові матері.

АТП були виявлені лише в однієї кролиці при дозі 5 мг/кг на 14 день вагітності, і не мали помітного впливу на концентрацію сотатерцепту в сироватці цієї тварини.

На основі цих даних дози сотатерцепту ≤ 15 мг/кг, що вводять підшкірно на 7 і 14 дні вагітності, були рекомендовані для дослідження токсичності для розвитку у вагітних кролиць.

Сотатерцепт: GLP дослідження сотатерцепту для ембріо-фетального розвитку при введенні один раз на тиждень шляхом підшкірної ін'єкції у кролів

Цілі цього GLP дослідження полягали у виявленні несприятливого впливу сотатерцепту на вагітних новозеландських білих кролиць і розвиток ембріона та плоду. Двадцяти ймовірно вагітним новозеландським білим кролицям/групу вводили носій або сотатерцепт у дозах 0,5, 1,5 або 5 мг/кг підшкірно на 7 і 14 день вагітності (загалом 2 дози). Додатково 3 кролиці/групу використовували для визначення ТК та АТП.

Усіх кролиць було піддано евтаназії та розтину на 29 день вагітності. Були оцінені наступні параметри та кінцеві точки: життєздатність, клінічні ознаки, маса тіла, приріст маси тіла, споживання їжі, загальні результати розтину, дослідження яєчників і матки, маса тіла плода та стать, а також зовнішнє, вісцеральне, корональне та скелетне дослідження плода. Аналіз ТК та імуногенності (АТП) проводили на контрольній групі та групі, яка отримувала лікування.

Усі кролиці вижили до запланованої евтаназії, і не було виявлено впливу препарату на материнські параметри на будь-якому рівні дози.

	Збільшення середньої втрати після імплантації призвело до зниження середньої кількості живих плодів при дозі 5 мг/кг. Крім того, дозозалежна нижча середня маса плоду (самці, самки та комбіновано) спостерігалася в групах 1,5 та 5 мг/кг (комбінована маса на 13 % та 18 % менша, ніж у контрольній групі відповідно), що корелювало з меншою середньою кількістю ділянок осифікації (п'ясткові кістки, фаланги передніх кінцівок та фаланги задніх кінцівок) при 5 мг/кг. Жодних аномалій розвитку плода (вад розвитку або відмінностей), пов'язаних із сотатерцептом, не спостерігалася в ні в одній з груп дозування. Більшість антитіл до сотатерцепту було виявлено на 29 день вагітності (ДВ) після другої дози. Антитіла були виявлені у 1/23 (4,3 %) тварин з контрольної групи, 10/23 (43,5 %) тварин, які отримували дозу 0,5 мг/кг, 10/23 (43,5%) тварин, які отримували дозу 1,5 мг/кг, і 8/23 (34,8 %) тварин, які отримували дозу 5 мг/кг. Загальний рівень захворюваності у тварин, які отримували сотатерцепт, становив 40,6 %. У підгрупі ТК, АТП в одній тварини з дозою 0,5 мг/кг і двох тварин з дозою 1,5 мг/кг мали вплив на експозицію сотатерцепту на 14 день вагітності. У підсумку, материнська NOAEL у вагітних кролиць, яким одноразово вводили сотатерцепт шляхом підшкірної ін'єкції на 7 і 14 день вагітності (загалом 2 дози), становив 5 мг/кг, що відповідало материнському AUC_{0-366h} 10 900 мкг*год/мл. Токсичність розвитку (вища середня постімплантаційна втрата, менша середня кількість живих плодів, менша середня маса плоду та менша середня кількість ділянок окостеніння) спостерігалася при дозі 5 мг/кг. Крім того, нижчу середню вагу плода спостерігали в групі дозування 1,5 мг/кг. Базуючись на цих результатах, NOAEL для розвитку вважалася рівною 0,5 мг/кг, що відповідає материнській AUC_{0-366h} 1070 мкг*год/мл (у 0,4 рази більше клінічної експозиції при MRHD) після введення дози на 14 день вагітності.
пренатальна і постнатальна токсичність	Сотатерцепт: GLP дослідження розвитку та перинатального/постнатального репродуктивного впливу підшкірного введення сотатерцепту у шурів, включаючи постнатальну поведінкову/функціональну оцінку Цілі цього дослідження полягали у виявленні несприятливих ефектів сотатерцепту на щурах лінії Спрег-Доулі та розвиток потомства. Оскільки прояви ефектів, індукованих протягом цього періоду, можуть бути відстроченими, спостереження продовжували до статевої зрілості шурів покоління F1. Крім того, було визначено АТП-ефекти сотатерцепту на самок покоління F0. Загалом 132 самки шурів лінії Спрег-Доулі, злучені за певний час, були випадковим чином розподілені на 6 дозових груп по 22 щури на групу. Оскільки відомо, що утворення АТП у

щурів після багаторазового введення зменшує системну експозицію, щури-матері покоління F0 у цьому дослідженні отримували сотатерцепт під час вагітності або протягом періоду лактації.

Передбачувано вагітним самкам щурів вводили сотатерцепт та/або сурогат (фізіологічний розчин) і носій-контроль підшкірно на 6 і 13 ДВ, або 1, 8 і 15 дні лактації (ДЛ). Самки щурів F0, які отримували лікування протягом періоду вагітності (дві групи), отримували сотатерцепт у дозі 1,5 або 5 мг/кг відповідно на 6 і 13 ДВ, після чого вводили дозу фізіологічного розчину на 1, 8 і 15 ДЛ. Самки щурів F0, які отримували лікування протягом періоду лактації (три групи), отримували фізіологічний розчин на 6 і 13 ДВ, а потім сотатерцепт у дозі 1,5, 5 або 10 мг/кг, відповідно, на 1, 8 і 15 ДЛ. Щурам з контрольної групи покоління F0 вводили фізіологічний розчин на 6 і 13 ДВ, а потім дози носія на 1, 8 і 15 ДЛ. Самкам щурів покоління F0 дозволили народити природним шляхом. На 21 ДЛ самців і самок покоління F1 було відлучено від грудей, і 264 дитинчат (1/групу F0/стать/послід) було відібрано для продовження дослідження для оцінки будь-якого потенційного впливу на ріст і поведінку. Усі матері та всі дитинчата, які не були відібрані для продовження оцінки, були піддані евтаназії на 21 ДЛ після пологів. Щурам покоління F1 під час дослідження безпосередньо не вводили сотатерцепт, фізіологічний розчин або контрольну речовину.

Наступні параметри та кінцеві точки були оцінені у всіх щурів покоління F0: життєздатність, клінічні ознаки, маса тіла, збільшення маси тіла, споживання їжі, природні пологи та спостереження за матір'ю, дослідження яєчників і матки, а також макроскопічні спостереження.

Зразки крові відбирали у всіх щурів покоління F0 перед початком дозування на 6 ДВ (тільки групи 1-3) і ДЛ 1, а також перед розтином на 21 ДЛ (усі групи) для оцінки антитіл до сотатерцепту.

Наступні параметри та кінцеві точки були оцінені у всіх щурів покоління F1: життєздатність, клінічні ознаки, маса тіла, статеве дозрівання, рухова активність, звикання до акустичного переляку, навчання та пам'ять (водний лабіринт Морріса), спаровування, дослідження яєчників і матки, а також макроскопічні спостереження.

Усі самки покоління F0 дожили до запланованої евтаназії. Жодних ефектів, пов'язаних із сотатерцептом, не спостерігалось у самок покоління F0 під час періоду вагітності або лактації за будь-яким із наступних параметрів: клінічні ознаки, середня маса тіла матері або збільшення маси тіла, природні пологи, поведінка матері та макроскопічні спостереження.

Зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, у самок F0 обмежувалися зниженням середнього споживання корму

матір'ю від 10 до 15 ДЛ для групи, яка отримувала дозу 10 мг/кг у період лактації матері, що не вважалося несприятливим за відсутності відповідних клінічних ознак або впливу на масу тіла.

Не спостерігалось впливу на послід у поколінні F0 при будь-якому рівні дози, яка вводилася під час вагітності або лактації, що оцінювалося за кількістю матерів, що народили послід, тривалістю вагітності, місцями імплантації на народжений послід, індексом вагітності (відсоток вагітностей, які призвели до народження живих послідів), кількістю живонароджених і мертвонароджених дитинчат, індексом життєздатності (відсоток щуренят, які вижили від народження до 4 ДЛ), індекс лактації (відсоток народжених щуренят, які вижили до відлучення), кількість щуренят, які вижили, на послід, співвідношення статей і розмір живого посліду під час зважування.

У тварин F0, які отримували дозу під час гестації (кровили на 1 і 21 ДЛ) або під час лактації (кровили лише на 21 ДЛ), АТП були виявлені у 2/22 (9,1 %) тварин у контрольній групі, 7/22 (31,8 %) тварин у групі вагітних 1,5 мг/кг, 16/22 (72,7 %) тварин у групі вагітності 5 мг/кг, 4/21 (19,0 %) тварин у групі лактації 1,5 мг/кг, 7/20 (35,0 %) тварин у групі лактації 5 мг/кг і 3/21 (14,3 %) тварин у групі лактації 10 мг/кг, із загальним рівнем наявності антитіл 34,9 % (37 із 106) у тварин, які отримували сотатерцепт.

Протягом періодів до і після відлучення не спостерігалось смертельних випадків, пов'язаних із досліджуванним препаратом, або несприятливих клінічних спостережень у нащадків чоловічої та жіночої статі покоління F1 у будь-якій материнській групі дозування.

Під час періоду перед відлученням у щуренят від матерів, які під час гестації отримували сотатерцепт у дозах 1,5 та 5 мг/кг, тимчасове зниження середньої маси тіла дитинчат (самця, самки та статі разом порівняно з контрольною групою), пов'язане з досліджуванним препаратом, спостерігалось лише на 1-й післяпологовий день (ППД) і не вважалося несприятливим.

У щуренят від самок, які отримували під час лактації ≥ 5 мг/кг, спостерігалось зниження маси тіла та приріст маси тіла, які залежали від дози (за величиною та часом початку). Середня маса тіла щуренят була знижена перед відлученням у самців з 5 мг/кг (починаючи з 15 ППД; на 9 % - 13 % менше, ніж у контрольній групі) і у самців і самок з 10 мг/кг (починаючи з 8 і 10 ППД відповідно; на 9 % - 20 % менше, ніж у контрольній групі), а у самок з 5 мг/кг середня маса тіла зменшувалася до кінця періоду відлучення (на 9 % менше, ніж у контрольній групі на 21 ППД). У цих щуренят зниження маси тіла та збільшення маси тіла тривали протягом періоду після відлучення. Зменшення приросту маси тіла після відлучення відбувалося протягом кількох

виміряних інтервалів у самців і самок при дозі 5 мг/кг, так що приріст маси тіла протягом усього періоду після відлучення був зменшений (на 11 % менше, ніж у контрольній групі з 22 до 106 ППД для самців; на 4 % менше, ніж у контрольній групі з 22 до 92 ППД для самок). Подібним чином, зниження приросту маси тіла у самців і самок у дозі 10 мг/кг після відлучення від грудей відбувалося протягом усіх (самці) або більшості (самок) інтервалів вимірювання, так що приріст маси тіла протягом усього періоду після відлучення був зменшений (на 15 % менше з 22 до 106 ППД у самців і на 8 % менше з 22 до 92 ППД у самок). У результаті середня маса тіла залишалася зниженою протягом періоду після відлучення в дозах 5 мг/кг (на 11 % менше, ніж у самців на 106 ППД; на 5 % менше у самок на 92 ППД) і 10 мг/кг (на 16% менше у самців на 106 ППД; на 10 % менше у самок на 92 ППД).

Крім того, хоча середній приріст маси тіла у самок, які отримували 10 мг/кг, був подібним до контрольної групи протягом періоду вагітності, середня маса тіла залишалася зниженою під час вагітності (на 8 % менше, ніж у контрольній групі) через попереднє зниження приросту. У сукупності, результати відображають пов'язане із сотатерцептом зниження маси тіла та збільшення маси тіла при дозах 5 і 10 мг/кг, починаючи з періоду до відлучення та продовжуючи в період після відлучення, що призвело до зниження середньої маси тіла в дорослому віці. Тому ці ефекти вважаються несприятливими.

Затримки статевого дозрівання спостерігалися у тварин F1 у групах матерів з лактацією при дозі ≥ 5 мг/кг, вторинно до зменшення маси тіла щуренят у цих дозових групах. У поколінні F1 збільшення (порівняно з котрольною групою) середнього дня відділення препуціуму спостерігалось у самців у групах матерів з лактацією при дозі 5 і 10 мг/кг (+3,1 і +3,5 дня відповідно), і середнього дня прохідності піхви – у самок у групі матерів з лактацією при дозі 10 мг/кг (+2,4 дня). Не спостерігалось впливу на статеве дозрівання в групі, яка отримувала дозу 1,5 мг/кг у період материнської лактації, і не спостерігалось змін у поколінні F1, коли щурам покоління F0 вводили дозу під час вагітності. Крім того, не було жодного впливу на репродуктивну здатність самців або самок у тварин F1 при будь-якому рівні дози з обох материнських сегментів.

Не спостерігалось жодних ефектів, пов'язаних із досліджуваним препаратом, під час оцінювання акустичного сполаху, рухової активності та водного лабіринту Морріса.

Не спостерігалось жодних ефектів, пов'язаних із сотатерцептом в поколінні F1 з обох материнських сегментів під час макроскопічного розтину, а також не спостерігалось змін параметрів яєчників і матки за кількістю жовтих тіл, імплантацій, відсотку втрати до імплантації, життєздатних та

	нежиттєздатних ембріонів і відсотку втрати після імплантації. У підсумку, сотатерцепт добре переносився вагітними самками щурів при підшкірному введенні в дозах 1,5 і 5 мг/кг на 6 і 13 ДВ або в дозах 1,5, 5 і 10 мг/кг на 1, 8 і 15 ДЛ. Ефекти F0, пов'язані з досліджуванним препаратом, були обмежені тимчасовим несприятливим зниженням споживання їжі в групі лактації 10 мг/кг. Таким чином, NOAEL сотатерцепту для матерів становила 5 мг/кг або 10 мг/кг при застосуванні під час вагітності або лактації відповідно, а репродуктивна NOAEL становить 5 мг/кг при застосуванні під час вагітності та 10 мг/кг при застосуванні під час лактації. Побічні ефекти, пов'язані із застосуванням сотатерцепту, на масу тіла щуренят, приріст маси тіла щуренят та/або статеве дозрівання спостерігалися як у самців, так і у самок покоління F1 із груп при дозах 5 та 10 мг/кг у період лактації матері. Не було виявлено жодних ефектів у поколінні F1, пов'язаних із введенням сотатерцепту матері, на смертність щуренят, клінічні ознаки, рухову активність, навчання та пам'ять (акустичний переляк або водяний лабіринт Морріса), спарювання та фертильність або параметри яєчників і матки. На основі цих даних NOAEL для життєздатності та росту потомства при введенні сотатерцепту вагітним самкам щурів під час вагітності або лактації становила 5 мг/кг (у 2 рази більше клінічної експозиції при MRHD) і 1,5 мг/кг (0,6 рази більше клінічної експозиції при MRHD) відповідно.
дослідження, при яких препарат уводиться потомству (нестатевозрілим тваринам) та/або оцінюється віддалена дія	Сотатерцепт: дванадцятитижневе дослідження токсичності при підшкірному введенні сотатерцепту молодим щурам, включно з періодом відновлення Метою цього GLP дослідження було визначити потенційний вплив сотатерцепту на ріст і розвиток, нейроповедінковий розвиток, імунну компетентність і репродуктивну функцію при підшкірному введенні молодим щурам лінії Спрег-Доулі один раз на тиждень з 7 до 91 ППД і після 13-тижневого періоду без лікування. Сотатерцепт вводили підшкірно молодим щурам лінії Спрег-Доулі один раз на тиждень, починаючи з 7 ППД і продовжуючи до 91 ППД, загалом 13 доз. Сотатерцепт вводили в дозах 0 (носій), 0,3, 3 або 30 мг/кг раз на тиждень. Десять тварин на стать/групу (основні досліджувані тварини, підгрупа 1) і 20 тварин на стать/групу (тварини, які не отримували лікування, підгрупа 2) були призначені для оцінки кінцевих точок токсичності на 98 ППД (кінець періоду дозування) та на 238 або 239 ППД (кінець 13-тижневого періоду без лікування), відповідно. Окремі групи тварин лікували та використовували для визначення параметрів ТК сотатерцепту та АТП (21-24 тварини на стать/групу, підгрупа 3), а також для оцінки TDAR та проведення оцінок імунофенотипу (20 щурів на стать у групах 0, 0,3 та 3 мг/кг раз на тиждень, підгрупа 4). Молодих

щурів оцінювали на смертність, клінічні ознаки та зміни споживання їжі, маси тіла, статевого дозрівання, рухової активності, кінцевих точок функціональних спостережних тестів (FOB) і водяного лабіринту Морріса, тривалості естрального циклу, репродуктивної здатності, концентрації гормонів крові (ФСГ, ЛГ, тестостерону, прогестерону, естрадіолу та еритропоєтину (ЕРО)), TDAR і параметри імунотипу, щільність (стегнової) кістки та кінцеві точки клініко-анатомічної патології. Виконували оцінку ТК у сироватці крові (у контрольних і оброблених тварин) і АТП. Не було жодних змін, пов'язаних із досліджуванним препаратом, у аналізі сечі, параметрах ЕРО, FOB або змін у продуктивності подолання водяного лабіринту Морріса.

Групу з дозуванням 30 мг/кг раз на тиждень було евтаназовано на 30 ППД (після 3 доз) через велику кількість незапланованих смертей, пов'язаних із досліджуванним препаратом, та погіршенням клінічного стану тварин, що залишилися. При дозі 30 мг/кг раз на тиждень зазвичай спостерігалися зневоднення, худорлява зовнішність, зниження рухової активності та/або недоглянута шерсть, що корелювало зі зменшенням збільшення маси тіла. Зміни клінічної патології при дозі 30 мг/кг раз на тиждень зазвичай включали збільшення еритроїдної маси, яке було фармакологічно опосередковане, підвищення трансаміназ печінки та зміну параметрів, що вказують на пошкодження нирок. Посмертні результати, пов'язані з досліджуванним препаратом, при дозі 30 мг/кг раз на тиждень зазвичай включали помітне червоне забарвлення нирок і гістоморфологічні зміни, які включали дилатацію/атрофію/гіпоплазію/мінералізацію каналців у нирках, крововилив/застій у мозковій речовині нирок, застій у надниркових залозах/вакуолізацію, мінералізацію залозистої слизової оболонки шлунка, і зниження клітинності білої пульпи та/або крайової зони в селезінці.

Не було жодних незапланованих смертей, пов'язаних із досліджуванним препаратом, при дозі ≤ 3 мг/кг раз на тиждень у тварин, призначених для визначення ТК та АТП (підгрупа тварин 3) або TDAR та імунотипування (підгрупа тварин 4).

При дозі 3 мг/кг раз на тиждень у основних досліджуваних тваринах протягом періоду дозування передсмертні результати, пов'язані з досліджуванним препаратом, були подібними, але загалом менш серйозними, ніж ті, що спостерігалися при дозі 30 мг/кг раз на тиждень. При дозі 3 мг/кг раз на тиждень у основних досліджуваних тварин спостерігалися позапланові випадки смерті, несприятливі клінічні ознаки, зниження середньої маси тіла та збільшення маси тіла у самок (тимчасово) і самців, а також зменшення споживання їжі у самців. Інші передсмертні зміни при дозі 3 мг/кг раз на тиждень протягом періоду дозування включали

затримку статевого дозрівання у самців і самок, що вважалося вторинним по відношенню до впливу на масу тіла, і зменшення загального часу, проведеного в русі під час оцінки рухової активності у самців. При дозі 0,3 мг/кг раз на тиждень протягом періоду дозування на основних досліджуваних тваринах клінічні ознаки обмежувалися тимчасовим обмеженням використанням кінцівок. Зміни клінічної патології, пов'язані з досліджуванним препаратом, у основних досліджуваних тварин протягом періоду введення дози $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень включали мінімальне або помірне підвищення параметрів, що вказують на еритроцитарну масу. При дозі 3 мг/кг раз на тиждень додаткові зміни включали мінімальне збільшення параметрів лейкоцитів, мінімальне збільшення фібриногену та мінімальне зниження тромбоцитів.

Зміни клінічних хімічних параметрів, що вказують на ниркову токсичність (помірне підвищення азоту сечовини крові, креатиніну та/або фосфору та помірне зниження альбуміну) при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень корелювали з мікроскопічними результатами в нирках.

Під час запланованої евтаназії на 98 ППД для основних досліджуваних тварин (0, 0,3 і 3 мг/кг раз на тиждень) ефекти, пов'язані із сотатерцептом, спостерігалися при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень, і включали макроскопічні зміни в яєчках (ненормальної консистенції та малих розмірів), простаті (маленьких розмірів) та/або нирках (знебарвлення, заповнені рідиною кісти). Зміни маси органів включали зменшення маси серця у самців при $\geq 0,3$ мг/кг, зменшення ваги яєчок/придатків яєчок, передміхурової залози та селезінки (тільки для самок) при 3 мг/кг раз на тиждень, і збільшення ваги нирок при 3 мг/кг раз на тиждень.

На 98 ППД для тварин основного дослідження гістоморфологічні зміни були присутні в нирках при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень, і включали мінімальну або помірну мінералізацію каналців, мінімальну або виражену дилатацію каналців, мінімальну або помірну хронічну прогресуючу нефропатію, мінімальний або помірний мембранопрліферативний гломерулонефрит, мінімальний або легкий крововилив, мінімальну або помірну атрофію/гіпоплазію каналців у мозковій речовині та збільшення строми в мозковій речовині. Мінімальна або помірна мінералізація залозистої слизової оболонки шлунка спостерігалася у самців при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень і у самок при 3 мг/кг раз на тиждень. При дозі $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень спостерігалася виражена дегенерація та атрофія сім'яних каналців і легкий або помірний набряк яєчок. Мінімальна або помірна гіперплазія клітин Лейдіга спостерігалася в яєчках при дозі 3 мг/кг раз на тиждень. У передміхуровій залозі та сім'яних пухирцях атрофія від мінімального до легкого ступеня спостерігалася при дозі

3 мг/кг раз на тиждень. Помітне зменшення сперматозоїдів із мінімальним або помірним збільшенням продуктів клітинного розпадань було відмічено в епідидимідах при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень, і вважалося вторинним до дегенерації/атрофії яєчок. У селезінці спостерігалось зниження клітинності в періартеріолярних оболонках та/або крайових зонах білої пульпи, зниження екстрамедулярного кровотворення в червоній пульпі та/або збільшення клітинності в червоній пульпі у самців при 3 мг/кг раз на тиждень і у самок при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень. У кістковому мозку самок при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень спостерігалось зменшення кількості (острівців) незрілих (бластних) мієлоїдних елементів із відносним або абсолютним збільшенням еритроїдних елементів і нейтрофілів. У тимусі кількох самок при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень спостерігався підвищений некроз окремих клітин у корі та мозковому шарі. Нарешті, лише у самок спостерігалася гіпертрофія клітин кори надниркової залози при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень і в дистальній/проміжній частинах гіпофіза при 3 мг/кг раз на тиждень.

Протягом періоду без лікування була 1 незапланована смерть, пов'язана з досліджуванним препаратом, при дозі 3 мг/кг раз на тиждень. Клінічні ознаки та патологоанатомічні дані загалом були подібні до тих, які були присутні у тварин із дозуванням 3 мг/кг раз на тиждень, які загинули під час періоду введення дози. Не було жодних незапланованих смертей, пов'язаних із досліджуванним препаратом при дозі 0,3 мг/кг раз на тиждень протягом періоду без лікування.

Не було жодних клінічних ознак, пов'язаних із досліджуванним препаратом, при дозі ≤ 3 мг/кг раз на тиждень протягом періоду без лікування (за винятком тих, що спостерігалися у тварин із позаплановою смертю).

Лише у самців зниження маси тіла при дозі 3 мг/кг раз на тиждень зберігалось протягом періоду без лікування, але повністю відновлювалось перед спарюванням.

Не було жодних змін у споживанні їжі при ≤ 3 мг/кг раз на тиждень протягом періоду без лікування.

У тварин у періоді без лікування на 237-239 ППД зміни клінічної патології, пов'язані з досліджуванним препаратом, загалом були від мінімальних до легких і обмежувалися збільшенням еритроїдної маси у самок при дозі 3 мг/кг раз на тиждень, зниженням кількості тромбоцитів у самок у дозі 3 мг/кг раз на тиждень, підвищенням фібриногену у самців у дозі 3 мг/кг раз на тиждень, зниженням альбуміну у самців при дозі 3 мг/кг раз на тиждень та збільшенням холестерину при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень. На 13 ДВ зміни клінічної патології у самок, які отримували сотатерцепт і були злучені протягом періоду без лікування, були обмежені мінімальним підвищенням АЛТ, АСТ і глюкози при 3 мг/кг раз на

	тиждень, а також помірним підвищенням рівня холестерину при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень. Протягом періоду без лікування спостерігалось зниження індексів фертильності самців і самок, частоти вагітності у самок, які не отримували лікування, злучених із самцями, які отримували лікування, при дозі 3 мг/кг раз на тиждень, а також частоти вагітності у самок, які отримували лікування, при дозі $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень. Серед самок, які отримували сотатерцепт, також спостерігалось збільшення відсотка тварин з нежиттєздатними ембріонами (включаючи 1 виводок з лише нежиттєздатними ембріонами) при дозі 3 мг/кг раз на тиждень. Наприкінці періоду без лікування (238/239 ППД) пов'язані із сотатерцептом посмертні ефекти у досліджуваних тварин періоду без лікування при дозі $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень були подібними до тих, які спостерігалися наприкінці періоду введення дози, і включали макроскопічні зміни в яєчках і нирках, зміни маси органів у яєчках, простаті, нирках і серці, а також мікроскопічні зміни в нирках, шлунку, яєчках (за винятком гіперплазії клітин Лейдіга) і селезінці. У надниркових залозах у самок при дозі 0,3 мг/кг раз на тиждень кортикальна гіпертрофія більше не спостерігалася, але спостерігалось підвищення частоти кісточної дегенерації при дозі 3 мг/кг раз на тиждень. У гіпофізі, кістковому мозку чи тимусі не виявлено жодних змін. Незначні зміни концентрації гормонів у крові спостерігалися лише при дозі 3 мг/кг раз на тиждень. Наприкінці періоду прийому спостерігалось підвищення ЛГ у самців і зниження ЛГ і ФСГ у самок. Наприкінці періоду без лікування спостерігалось підвищення ЛГ і ФСГ лише у самців. Ці зміни мали невизначений зв'язок із лікуванням і не вважалися токсикологічно значущими. Як міра щільності кісткової тканини, мінеральний вміст кісткової тканини (МВКТ) і мінеральна щільність кісткової тканини (МЩКТ) (загальна, проксимальна, середня та дистальна частина стегнової кістки) були дещо збільшені при дозі 0,3 мг/кг раз на тиждень наприкінці періоду введення дози у тварин основного дослідження без одночасного впливу на гормони. Хоча відмінності були невеликими та не залежали від дози при дозі 0,3 мг/кг раз на тиждень, відмінності були постійними серед самців і самок і, ймовірно, були пов'язані із сотатерцептом. Наприкінці періоду без лікування глобальна та проксимальна МЩКТ і МВКТ середньої стегнової кістки та МЩКТ були статистично значно нижчими у самців при дозі 3 мг/кг раз на тиждень, але вважалось, що зв'язок із лікуванням сотатерцептом невизначений. Після щотижневого дозування протягом 12 тижнів експозиція сотатерцепту в діапазоні доз (від 0,3 до 3 мг/кг раз
--	--

на тиждень) зросла в 1,7-3,2 рази у самців і в 1,5-3,8 рази у самок.

АТП не було виявлено у тварин, протестованих на 128 ППД. Проте АТП було виявлено в 1 самки при 0,3 мг/кг раз на тиждень і 1 самки при 3 мг/кг раз на тиждень на 13 ДВ, а також у 1 самця на 239 ППД при 3 мг/кг раз на тиждень. У деякі моменти часу підвищені рівні циркулюючого сотатерцепту могли перешкоджати виявленню АТП, що призводило до хибно негативних результатів.

Оцінку TDAR та імунофенотипування проводили протягом періоду дозування та періоду без лікування. Протягом періоду дозування спостерігалось зниження Т-залежної відповіді антитіл IgM до KLH, але не було змін у відповіді антитіл IgG при дозі 3 мг/кг раз на тиждень. У 2-6 тварин на стать/групу, що залишилися протягом періоду без лікування, не було помітного впливу на продукування KLH-специфічних IgM або IgG при ≤ 3 мг/кг раз на тиждень.

Зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, в оцінках імунофенотипу включали дозозалежну тенденцію збільшення (статистично значущої) кількості CD45+ лімфоцитів, що спостерігалася на 56 ППД у самців і самок при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень, порівняно з контрольною групою, що призвело до дозозалежного збільшення абсолютної кількості загальних Т-клітин, В-клітин, CD4+ Т-клітин і CD8+ Т-клітин у самців і самок. Абсолютна кількість клітин природних кілерів (NK) істотно не відрізнялася в групах, які отримували сотатерцепт; однак збільшення абсолютної кількості лімфоцитів CD45+ призвело до статистично значущого зниження процентного вмісту NK-клітин у самців при 3 мг/кг раз на тиждень і у самок при 0,3 і 3 мг/кг раз на тиждень. Відсоток Т-клітин був статистично значно нижчим у самок, які отримували 0,3 та 3 мг/кг раз на тиждень; однак абсолютна кількість Т-клітин у цих тварин була загалом збільшена порівняно з контрольною групою. Відсоток В-клітин був статистично значно вищим у самців, які отримували 3 мг/кг раз на тиждень, що разом зі збільшенням кількості CD45+ лімфоцитів збільшило абсолютну кількість В-клітин у цій групі порівняно з контрольною групою. Співвідношення Т:В-клітин продемонструвало статистично значущу тенденцію меншої кількості Т-клітин у пропорції до В-клітин у самців, яким вводили сотатерцепт лише на 237 ППД. Загалом динамічні зміни в підгрупах лімфоцитів спостерігалися при $\geq 0,3$ мг/кг раз на тиждень. Ці зміни від мінімальних до помірних (у 2-3 рази у В-клітинах і < 2 -кратно у загальній кількості лімфоцитів, Т- і NK-клітин) відображали легкий і тимчасовий ефект активації лімфоцитів після введення антигену (KLH) і мали мінімальне токсикологічне значення. Через невелику кількість тварин, що залишилися для оцінки періоду без лікування (від 2 до 6 тварин на стать/групу),

відновлення щодо змін імунотипу не можна було точно визначити.

У підсумку, на основі несприятливої клінічної патології та посмертних змін, які не виявилися оборотними, а також зниження індексів фертильності та вагітності самок, що спостерігалися протягом періоду без лікування, NOEL та NOAEL для цього дослідження становили $< 0,3$ мг/кг раз на тиждень ($< 0,6$ рази більше клінічної експозиції при MRHD).

Сотатерцепт: Тринадцятитижневий дослідження токсичності сотатерцепту, який вводили підшкірно молодим щурам, включаючи період відновлення

Метою цього GLP дослідження було визначити потенційний вплив сотатерцепту на ріст і розвиток, нейроповедінковий розвиток, імунну компетентність і репродуктивну функцію при підшкірному введенні молодим щурам лінії Спрег-Доулі раз на тиждень з 7 до 91 ППД з подальшим 18-тижневим періодом без лікування.

Сотатерцепт вводили підшкірно молодим щурам лінії Спрег-Доулі раз на тиждень, починаючи з 7 ППД і продовжуючи до 91 ППД, загалом 13 доз. Сотатерцепт вводили в дозах 0 (носій), 1, 3 або 10 мг/кг раз на тиждень. Кінцеві точки токсичності оцінювали у 10 тварин на стать/групу (тварини основного дослідження, підгрупа 1) до кінця періоду дозування на 98 ППД та у 20 тварин на стать/групу (тварини, які не отримували лікування, підгрупа 2) до кінця 18-тижневого періоду без лікування на 15 ДВ для самок та 233 ППД для самців. Щури підгрупи 1 отримували додаткову дозу на 98 ППД. Окремі групи тварин лікували та використовували для визначення параметрів ТК сотатерцепту та АТП (24 тварини на стать/групу та 1 з контрольної групи, що складається з 6 щурів/стать, підгрупа 3), а також для оцінки TDAR та проведення оцінок імунотипу (20 щурів на стать/групу, підгрупа 4). Молодих щурів оцінювали на смертність, клінічні ознаки та зміни споживання їжі, маси тіла, статевого дозрівання, рухової активності, кінцевих точок FOB та навчання та пам'яті (лабіринт Біля), тривалості естрального циклу, репродуктивної здатності, концентрації гормонів крові (ФСГ, ЛГ, тестостерону, прогестерону, естрадіолу та ЕРО), TDAR та параметрів імунотипу, щільність кістки (стегнової), а також клінічні та анатомічні патологічні кінцеві точки. Були проведені оцінки ТК сироватки (контрольні та тварини, які отримували лікування) та АТП (лише тварини, які отримували лікування).

Не було жодних незапланованих смертей, пов'язаних із досліджуванним препаратом, а також жодних змін у оцінках рухової активності, навчання та пам'яті (лабіринт Біля) або показників внутрішньоутробного виживання ембріона на 15 ДВ (втрата до імплантації, втрата після імплантації та

	середня кількість життєздатних ембріонів, жовтих тіл та місць імплантації). Результати, пов'язані з досліджуванним препаратом, спостерігалися на всіх рівнях доз протягом періоду дозування. У тварин основного дослідження спостерігалось збільшення випадків набрякання задніх кінцівок/обмеженого використання задніх кінцівок при дозі 10 мг/кг раз на тиждень, зниження маси тіла та споживання їжі у самців при дозі ≥ 1 мг/кг кожні 1 тиждень та затримки статевого дозрівання у самців при дозі ≥ 1 мг/кг раз на тиждень і самок при дозі ≥ 3 мг/кг раз на тиждень. У аналізі FOB зниження сили захоплення задніми кінцівками спостерігалось у самців при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень. Зміни клінічної патології, пов'язані з досліджуванним препаратом, у тварин основного дослідження протягом періоду дозування зазвичай включали незначне збільшення параметрів, що вказують на еритроцарну масу (RBC, HGB, HCT, абсолютна кількість ретикулоцитів, RDW, ширина розподілу гемоглобіну в еритроцитах (HDW)), і невелике зниження MCH, MCHC, MCV та/або тромбоцитів при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, і дуже незначне збільшення середнього значення об'єму тромбоцитів (MPV) і фібриногену при 10 мг/кг раз на тиждень. Зміни хімічного складу включали дуже незначне підвищення рівня лужної фосфатази у самок при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, та зміни, що вказують на ниркову токсичність (незначне збільшення BUN і хлориду [у окремих тварин] при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, а також підвищення креатиніну та/або фосфору та мінімальне зниження альбуміну, глобуліну та/або загального білка, що зазвичай відбувалося при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень), що загалом корелювало зі збільшенням позитивної реакції на білок у сечі при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень і зниженням питомої ваги сечі та збільшенням об'єму сечі при 10 мг/кг раз на тиждень та мікроскопічними змінами в нирках. Під час запланованої евтаназії тварин основного дослідження (підгрупа 1) на 98 ППД зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, включали макроскопічні зміни у яєчках і придатках яєчок (м'якої консистенції та невеликого розміру) при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, а також у нирках (розширені миски та вузлики) при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень. Зміни маси органів включали зменшення маси серця, придатків яєчок і передміхурової залози та збільшення маси яєчників на ≥ 1 мг/кг раз на тиждень. Зменшення ваги яєчок відбувалося при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень. На 98 ППД для тварин основного дослідження гістоморфологічні зміни були присутні в селезінці при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, і включали мінімальне або помірне зниження клітинності лімфоїдної тканини маргінальної зони та мінімальне або помірне підвищення клітинності червоної пульпи при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень. У нирках при ≥ 1 мг/кг
--	---

раз на тиждень виявлення включали мінімальну або помірну хронічну прогресуючу нефропатію та мембранопроліферативний гломерулонефрит, мінімальну або важку атрофію/гіпоплазію медулярних/папілярних канальців (зі збільшенням строми), легкий папілярний некроз, мінімальну або помірну дилатацію канальців і мисок, а також мінімальний або помірний крововилив. Мінімальна мінералізація залозистої слизової оболонки шлунка спостерігалася при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень. Збільшення частоти мінімальної або легкої перипортальної гепатоцелюлярної вакуолізації спостерігалася при дозі ≥ 1 мг/кг раз на тиждень. У корі надниркових залоз легкий або важкий некроз виникав при дозі ≥ 3 мг/кг раз на тиждень, а мінімальна та помірна гіпертрофія пучкової зони спостерігалася при дозі ≥ 1 мг/кг раз на тиждень. Від помірної до тяжкої двосторонньої дегенерації канальців яєчок і зменшення просвіту сперматозоїдів, а також від мінімального до помірного просвіту залишків клітинного розпадань у придатках яєчка спостерігалися при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень.

Протягом періоду без лікування на тваринах основного дослідження (підгрупа 2) не було смертельних випадків, пов'язаних із досліджуванним препаратом, а клінічні ознаки обмежувалися порушенням використання задніх кінцівок та/або набряком задніх кінцівок, які виникали при дозі 10 мг/кг раз на тиждень. Середня маса тіла у самців залишалася зниженою протягом періоду без лікування при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, і загалом корелювала зі зменшенням споживання їжі. Зміни в силі захоплювання, зазначені в FOB протягом періоду дозування, зникали у тварин у період без лікування.

Наприкінці періоду без лікування не було жодних змін гематології чи коагуляції, пов'язаних із досліджуванним препаратом. Зміни клінічної патології, пов'язані з досліджуванним препаратом, обмежувалися підвищенням азоту сечовини в крові, збільшенням об'єму сечі та зниженням питомої ваги сечі у самців при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень, а також підвищенням креатиніну та фосфору та зниженням хлоридів у одного самця з дозуванням 3 мг/кг раз на тиждень, які вважалися потенційно пов'язаними з лікуванням на основі відповідних змін у нирках.

Протягом періоду без лікування нижчі середні показники спаровування, фертильності та копуляції спостерігалися у самців, які отримували сотатерцепт, при дозі ≥ 1 мг/кг раз на тиждень у парі з самками, які не отримували лікування. Не спостерігалася жодних змін, пов'язаних із досліджуванним препаратом, у тривалості естрального циклу або параметрах репродуктивної ефективності у самок, які отримували сотатерцепт у парі з самцями, які раніше не отримували лікування.

Наприкінці періоду без лікування спостерігалися макроскопічні зміни в нирках, яєчках та придатках яєчок. Зміни маси органів в яєчниках і передміхуровій залозі зникли до розтину в періоді без лікування, а у самок, які отримували дозу 10 мг/кг раз на тиждень, спостерігалось збільшення ваги нирок на додаток до існуючих змін ваги серця, яєчок і придатків яєчок.

Гістоморфологічні зміни, що спостерігалися наприкінці періоду без лікування, загалом були подібні до тих, які спостерігалися під час попереднього розтину, за загальними винятками того, що мінімальна або помірна атрофія фасцикулянтної/ретикулярної зони була присутня в наднирковій залозі, та мінімальне або легке хронічне інтерстиціальне запалення в нирках при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень, і зниження клітинності крайової зони селезінки, дилатація ниркової балії та перипортальної гепатоцелюлярної вакуолізації.

У зразках, зібраних для аналізу гормонів наприкінці періоду дозування (під час еструсу для самок, починаючи з 92 ППД, і на 97 ППД для самців), зміни, пов'язані з досліджуванним препаратом, обмежувалися невеликим зниженням ФСГ у самок при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень і ФСГ та естрадіолу у самців при 10 мг/кг раз на тиждень, що не вважалося несприятливим. Це були гормональні зміни, не пов'язані з досліджуванним препаратом, на 184 ППД у самок і 232 ППД у самців.

Концентрації еритропоєтину були підвищені в окремих самців з ≥ 1 мг/кг раз на тиждень та в окремих самках при 10 мг/кг раз на тиждень наприкінці періоду дозування, і їх зв'язок із лікуванням вважався невизначений. Не було жодних змін, пов'язаних із досліджуванним препаратом, в ЕРО на 15 ДВ у самок або на 233 ППД у самців.

Не було змін у розмірах стегнової кістки, визначених під час жодного розтину (наприкінці періоду введення дози та наприкінці періоду без лікування). За допомогою рентгенівської абсорбціометрії з подвійною енергією (ex-vivo) були відзначені незначні зміни діаметра кістки (всієї стегнової кістки та зон поряд), МЩКТ та/або МВКТ при ≥ 1 мг/кг раз на тиждень наприкінці періоду дозування та періоду без лікування.

Після щотижневого дозування протягом 13 тижнів експозиція сотатерцепту в діапазоні доз збільшилася в 1,97-5,40 разів у самців і в 2,45-4,85 разів у самок. АТП не було виявлено у тварин ТК, перевірених на 128 ППД.

Концентрації сотатерцепту у тварин основного дослідження (підгрупа 1) на 98 ППД були подібними до концентрацій, присутніх у тварин ТК через 168 годин після введення дози у 91 ППД. За винятком 4 тварин, АТП не було виявлено у тварин основної фази (підгрупи 1 і 2), які тестувалися на 15 ДВ, 98 ППД і 233 ППД. У деякі моменти часу підвищені рівні

	циркулюючого сотатерцепту могли перешкоджати виявленню АТП, що призвело до хибно негативних результатів. Оцінку TDAR та імунофенотипування проводили під час періодів дозування та без лікування у тварин підгрупи 4. Не було виявлено жодних ефектів, пов'язаних із досліджуваним препаратом, на Т-залежну відповідь на антитіла IgM або IgG при провокуванні з KLH у тварин протягом періодів дозування або без лікування. У ході оцінки імунофенотипу під час фази дозування кількість лімфоцитів була збільшена у самців при ≥ 3 мг/кг раз на тиждень (ефект був відображений в плані В-клітин, але не в NK або Т-клітинах). У самок залежна від дози тенденція до зниження процентного вмісту NK-клітин при дозі ≥ 1 мг/кг раз на тиждень корелювала зі зменшенням абсолютної кількості NK-клітин при 10 мг/кг раз на тиждень у самок. Під час фази без лікування кількість лімфоцитів залишалася підвищеною у самців з 10 мг/кг раз на тиждень, але зміни NK-клітин у самок зникали. Ці зміни від мінімальних до помірних (у 2-3 рази у В-клітинах і < 2 разів у загальній кількості лімфоцитів і NK-клітин) відображають незначне збільшення активації лімфоцитів після провокування з KLH і не вважаються несприятливими через низьку величину зміни та тенденцію до відновлення у більшості підгруп лімфоцитів. У підсумку, на основі несприятливих посмертних змін, які не продемонстрували оборотності, затримки статевого дозрівання у самців і самок, а також зниження індексів фертильності самців, NOEL та NOAEL для цього дослідження становили < 1 мг/кг раз на тиждень ($AUC_{0-168h} = 3080$ мкг*год/мл, < 2-кратна клінічна експозиція при MRHD).
6) місцева переносимість	Місцеву переносимість оцінювали як частину досліджень повторних доз внутрішньовенного та підшкірного введення на щурах і маках. Сотатерцепт добре переносився щурами та маках місцево при обох шляхах введення.
7) додаткові дослідження токсичності:	
антигенність (утворення антитіл)	У рутинних дослідженнях токсичності повторних доз не виявлено ознак гіперчутливості або анафілаксії через потенційну імуногенність, спричинену сотатерцептом. Імуногенність (відповідь АТП) на сотатерцепт оцінювали в дослідженнях токсичності повторних доз у щурів і маках, у дослідженнях токсичності для розвитку та репродуктивної токсичності, а також у дослідженнях токсичності для молодих щурів. Сотатерцепт викликав відповіді АТП після повторних доз, що є типовим для багатьох біофармацевтичних препаратів у тварин.
імунотоксичність	На основі даних <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> з літератури відомо, що активіни відіграють певну роль у регуляції імунних відповідей. Відповідь змінюється залежно від типу клітин і залежить від дозрівання клітин, статусу активації клітин, а

також від просторового та часового контексту імунної відповіді. Було показано, що активін А регулює як запальну так і протизапальну відповідь у макрофагах, залежно від їхнього попереднього статусу активації. Крім того, активін А може стимулювати вироблення антитіл В-клітинами та може впливати на розвиток регуляторних Т-клітин. На відміну від цього, потенційні ефекти GDF-8, GDF-11 і BMP-10 на імунну функцію описані недостатньо. Хоча сотатерцепт може модулювати рівні активіну в кровообігу, він не блокує передачу сигналів залишкового ліганду на цільових клітинних рецепторах і мало ймовірно, що він буде перешкоджати аутокринній і паракринній передачі сигналів активіну.

Хоча існують літературні дані, які свідчать про можливість зміни імунної функції, остаточних доказів того, що сотатерцепт впливає на імунну функцію, немає. Одне дослідження сотатерцепту на макаках було припинено достроково через наявність інфекції плазмодія у багатьох тварин і передчасну смерть 1 тварини через фульмінантну малярію.

Плазмодій був присутній до початку дослідження, але його захворюваність і тяжкість зросли протягом 9-тижневого періоду дозування. Хоча можливо, що опосередковані сотатерцептом зміни в імунній функції підвищили сприйнятливості цих тварин до інфекції, добре відомо, що препарати, що стимулюють еритропоез, можуть посилити плазмодієву інфекцію шляхом збільшення популяції потенційних клітин-господарів. Тому вважається ймовірним, що опосередковане сотатерцептом збільшення кількості еритроцитів і ретикулоцитів, а не зміни імунної функції, підвищило сприйнятливості тварин, які отримували лікування до інфекції плазмодія.

У завершених доклінічних дослідженнях сотатерцепту відмічалось мінімальне або помірне виснаження лімфоїдів у тимусі макак при дозах ≥ 10 мг/кг раз на 2 тижні під час 27-тижневого дослідження і в селезінці при дозах $\geq 2,6$ мг/кг раз на 4 тижні під час 9-місячного дослідження. Однак у макак і дорослих щурів при всіх досліджених дозах не було жодних ознак дегенерації або некрозу в тимусі чи селезінці, жодних небажаних проявів в інших лімфоїдних тканинах, жодних значущих змін у циркулюючих лейкоцитах і жодних змін у концентрації глобуліну в сироватці крові. Незначні зміни у мієлоїдно-еритроїдному співвідношенні кісткового мозку у макак і молодих щурів відповідали помірному фармакологічно опосередкованому підвищенню еритроїдних параметрів і відбувалися за відсутності несприятливих змін у циркулюючих лейкоцитах. Лімфоїдні зміни у молодих щурів, як правило, обмежувалися мінімальним або помірним зменшенням клітинності в маргінальній зоні білої пульпи та/або мінімальним або помірним збільшенням клітинності в

	червоній пульпі селезінки. У базовому дослідженні молодих щурів не було жодних змін, пов'язаних із досліджуваним препаратом в аналізі TDAR, а дані імунофенотипування не вказували на пригнічення імунітету. Нарешті, у жодному доклінічному дослідженні сотатерцепту не було виявлено жодного сильного сигналу щодо гіперплазії та утворення пухлини. У підсумку, сукупність доклінічних даних свідчить про те, що сотатерцепт не має токсикологічно значущих імуномодуючих ефектів.
дослідження механізмів дії	Механізм дії оцінювався в рамках вторинних фармакодинамічних досліджень. Додаткових досліджень механізмів дії не проводилося.
лікарська залежність	Сотатерцепт — це білок з великою молекулярною масою, який не проникає через гематоенцефалічний бар'єр. Не було вказівок на те, що сотатерцепт має фармакологічний профіль, що відповідає потенційній схильності до зловживання лікарським засобом. Крім того, у дослідженнях токсичності повторних доз не було результатів неврологічної оцінки або клінічних ознак, які б свідчили про психоактивні ефекти (тобто седативні чи стимулюючі ефекти). Таким чином, жодних досліджень потенційного зловживання лікарським засобом з тваринами не проводилося, і потенціал зловживання лікарським засобом вважається дуже низьким.
токсичність метаболітів	Сотатерцепт — це білковий терапевтичний препарат, який повністю складається з природних амінокислот, і очікується, що типові протеолітичні шляхи будуть основним шляхом катаболізму. Потенційну токсичність метаболітів сотатерцепту оцінювали в рамках досліджень токсичності повторних доз. Додаткові дослідження метаболітів не проводились.
токсичність домішок	Жодних доклінічних досліджень з будь-якими окремими домішками не проводилося. Домішки в діючій речовині були кваліфіковані на зазначених рівнях у дослідженнях токсичності, проведених з різними серіями/партіями сотатерцепту.
інше	Фототоксичність Як зазначено в настанові S10 ICH (Оцінка фотобезпеки фармацевтичних засобів), ця настанова «зазвичай не застосовується до пептидів, білків, кон'югатів антитіл або олігонуклеотидів». Таким чином, оцінка білкового препарату, такого як сотатерцепт, на фототоксичність вважається необґрунтованою. Виходячи з цього обґрунтування, доклінічні дослідження фототоксичності для сотатерцепту не проводились і не плануються. RAP-011: 3-місячне дослідження інтраперитонеальної токсичності на мишах з 1-місячним відновленням Це дослідження GLP було проведено як дослідження токсичності на мишах CD-1 з використанням RAP-011, який є білком злиття, подібним до сотатерцепту. RAP-011 містить

Fc-фрагмент миші (IgG2a) замість Fc-фрагмента людини (IgG1). Мета цього дослідження полягала у виявленні токсичності для органів-мішеней після багаторазового введення дози гризунам, у яких не очікується розвиток реакції антитіл на досліджуваний препарат.

RAP-011 мишам вводили ін'єкційно двічі на тиждень. RAP-011, розчинений у носії, вводили в дозах 0 (носій), 10, 30 або 50 мг/кг двічі на тиждень протягом 3 місяців. Кожна група доз включала 20 тварин на статі/групу. Перші 10 тварин/статі/групи були призначені для розтину на 92-й день дослідження, а 10 тварин/статі/групи були призначені для розтину на 120-й день дослідження (після 1-місячного періоду без лікування).

Тварин оцінювали на смертність і зміни клінічних ознак, маси тіла, зміни маси тіла, споживання їжі, гематології та клінічної хімії, а також посмертних параметрів.

Смертність, пов'язана з досліджуваним препаратом, спостерігалася переважно при дозах ≥ 30 мг/кг двічі на тиждень. Незапланована смерть включала загалом 34 тварини, які отримували лікування, та, які були в критичному стані або знайдені мертвими (2/40, 15/40 і 17/40 тварин, які отримували дози 10, 30 і 50 мг/кг двічі на тиждень відповідно, починаючи приблизно з 60 дня дослідження). Через постійне погіршення стану самок, які вижили, з дозою 50 мг/кг двічі на тиждень, було евтаназовано на 74-й день дослідження, а всіх самців, які вижили з дозою 50 мг/кг двічі на тиждень (включно з тими, які були призначені для періоду без лікування), було евтаназовано на 92-й день дослідження (кінець періоду лікування). Під час розтину в грудній порожнині була виявлена рідина червоного кольору.

У тварин які загинули незаплановано та тварин, які вижили в діапазоні доз, клінічні ознаки включали прискорене дихання та грубу шерсть.

Невеликі транзиторні збільшення та зменшення середньої маси тіла/зміни маси тіла, пов'язані з досліджуваним препаратом, спостерігалися у самок і самців у всьому діапазоні доз, причому збільшення цих параметрів іноді корелювало зі збільшенням споживання їжі.

Параметри еритроцитів (RBC, RDW, HGB і HCT, а також кількість ретикулоцитів) були підвищені в усіх групах, які отримували RAP-011. Спостерігалася незначне, оборотне дозозалежне підвищення рівня печінкових ферментів (АСТ та АЛТ) разом із підвищенням натрію та тригліцеридів, які повністю зникли до 120-го дня дослідження (кінець періоду без лікування).

Під час запланованого розтину на 92-й день дослідження в діапазоні доз часто спостерігалася червона рідина в грудній порожнині, яка вказувала на гемоторакс. Це спостереження траплялося рідше у тварин, розтин яких проводили на 120-й день дослідження.

Середні показники маси серця та маси нирок були зменшені у самок і самців наприкінці періоду лікування (92-й день дослідження) та в період без лікування (120-й день дослідження).

Гістопатологічні зміни були подібними в усіх групах доз і спостерігалися в мозку, нирках, селезінці та тимусі, а в меншій мірі в серці та легенях. Вони включали мінімальну багатоголищеву мінералізацію судинного сплетення; мінімальну або помірну мультифокальну двосторонню дегенерацію/некроз клітин, що вистилають каналці, у корі нирки; мінімальний мультифокальний альвеолярний гістіоцитоз; і від мінімального до помірного дегенеративного/некрозу міокард шлуночків. Крім того, у селезінці спостерігалось від легкого до помірного посилення кровотворення. Зменшення лімфоїдної системи, відмічене в лімфоїдних органах (селезінці, тимусі та лімфатичних вузлах), ймовірно, було результатом виснаженого стану мишей.

Таким чином, інтраперитонеальне введення RAP-011 у дозах 10, 30 або 50 мг/кг двічі на тиждень, призвело до надмірної токсичності/смертності при дозах ≥ 30 мг/кг двічі на тиждень. Дози ≥ 10 мг/кг двічі на тиждень призвели до фармакологічно опосередкованого збільшення еритроїдних параметрів і селезінкового кровотворення, а також до зменшення ваги серця та нирок і гістопатологічних змін у судинній оболонці сплетення головного мозку. При явно токсичних дозах RAP-011 також викликав ураження каналців кори нирок, альвеолярний гістіоцитоз і дегенерацію/некроз міокарда шлуночків.

Сотатерцепт, ACE-536, RAP-011 та RAP-536: дослідження ниркової токсичності сотатерцепту, ACE-536, RAP-011 та RAP-536 у моделях 5/6 нефректомії або однобічної перев'язки сечоводу у самок щурів лінії Спрег-Дулі

Мета цього дослідження полягала в оцінці потенційних ефектів сотатерцепту та його мишачого аналога RAP-011, а також ACE-536 та його мишачого аналога RAP-536 у двох моделях ниркової недостатності у гризунів: 5/6 нефректомії та однобічне перев'язування сечоводу (ОПС). Нижче наведено лише результати досліджень сотатерцепту і RAP-011. У цьому дослідженні використовували моделі 5/6 нефректомії і ОПС компромісу ниркової функції. Кожна модель була протестована в одній із двох груп дослідження. Кожна група складалася з семи груп лікування 6 з яких були хірургічно зміненими та 3 тварини, які були псевдооперованими, і які отримували препарат підшкірно раз на тиждень протягом 13 тижнів. Сотатерцепт вводили підшкірно в дозах 1 або 10 мг/кг 1 раз на тиждень тваринам у групі дослідження 5/6 нефректомії (групи 2 і 3) і групі дослідження ОПС (групи 9 і 10). RAP-011 вводили підшкірно

в дозі 10 мг/кг раз на тиждень тваринам у групі дослідження 5/6 нефректомії (група 6) та групі ОПС (група 13). Групи 1 (група дослідження 5/6 нефректомії) і 8 (група дослідження ОПС) отримували контрольний носій. Операцію з 5/6 нефректомії проводили протягом 3-го тижня дослідження, а операцію ОПС — протягом 11-го тижня дослідження.

Параметри дослідження, які оцінювали, включали смертність, клінічні спостереження, масу тіла, споживання їжі, гематологію, креатинін сироватки, азот сечовини, параметри сечі (креатинін, об'єм і біомаркери альбумін, муцин Т-клітин Ig, також відомий як KIM-1 (молекула пошкодження нирок 1) (TIM-1), ліпокалін-2 і остеопонтин) і гістоморфологічне дослідження нирки. Були досліджені дані експресії нирок для 12 цільових генів і 8 транскриптів мікроРНК. Вимірювали концентрацію препарату сотатерцепт. АТП визначали для тварин, які отримували сотатерцепт і RAP-011.

Не було зафіксовано жодної смерті, пов'язаної з досліджуваними препаратами, а також не було змін маси тіла, споживання їжі, креатиніну сироватки крові, азоту сечовини або креатиніну сечі та параметрів об'єму. Не було жодних змін, пов'язаних із досліджуваним препаратом, у експресії генів нирок/мікрорібонуклеїнової кислоти (мікроРНК).

Набряк кінцівок, пов'язаний із досліджуваним препаратом, спостерігався у 1 тварини, яка отримувала сотатерцепт (1 мг/кг раз на тиждень), і незначне фармакологічно опосередковане збільшення маси еритроцитів (еритроцитів, HGB та HCT) спостерігалось при всіх дозах сотатерцепту та RAP-011 у щурів з 5/6 нефректомії та при 10 мг/кг сотатерцепту раз на тиждень та RAP-011 в щурів з ОПС.

Збільшення рівня біомаркерів альбуміну, TIM-1, ліпокаліну-2 та остеопонтину в нирках у сечі, пов'язане з досліджуваним препаратом, спостерігалось в більшості груп із нефректомованих тварин, які отримували сотатерцепт і RAP-011. Ліпокалін-2 був мінімально підвищений у тварин з ОПС, які отримували сотатерцепт і RAP-011.

У порівнянні з тваринами після нефректомії, які отримували носій, або відповідними групами фіктивно оперованих ACE і RAP, середні ступені тяжкості для порівнянного спектру змін клубочків помітно збільшувалися у тварин після нефректомії, які отримували сотатерцепт або RAP-011. Додаткові зміни в групах, які отримували лікування сотатерцептом і RAP-011 включали зміни в клубочках (накопичення гіаліну, утворення епітеліального півмісяця, збільшення товщини боуменової капсули, розширення боуменового простору та/або клубочкова атрофія), збільшення частоти та/або тяжкості тубулоінтерстиціальних уражень (тубулярна дилатація та/або базofilія, інтерстиціальна фіброплазія/фіброз та/або мононуклеарні

	запальні клітинні інфільтрати), а також посилення гломерулярного та тубулоінтерстиціального імунного фарбування для pSmad2 та αSMA. У групі дослідження ОПС гістоморфологічні зміни в нирках із обструкцією сечоводу були характерними для обструктивної нефропатії, і не було помітної різниці у тяжкості обструктивної нефропатії між групами лікування носієм, сотатерцептом і RAP-011. П'ятдесят вісім відсотків (58 %) тварин, які отримували сотатерцепт, і 11 % тварин, які отримували RAP-011, були визнані АТП-позитивними на 92-й день дослідження. У АТП-негативних тварин концентрації препарату в сироватці крові, виміряні після останньої дози, були в 2-10 разів вищими, ніж концентрації, виміряні після першої дози, що вказує на накопичення препарату. І навпаки, концентрація препарату зменшувалася протягом дослідження у більшості АТП-позитивних тварин. У підсумку, підшкірне введення сотатерцепту та RAP-011 1 раз на тиждень 5/6 тваринам після нефректомії спричинило помітне загострення клубочкових та тубулоінтерстиціальних уражень, посилення імунного фарбування pSmad2 та αSMA та підвищення рівня альбуміну в сечі, TIM-1, ліпокаліну-2 та/або остеопонтину у порівнянні з групами лікування сотатерцептом і RAP-011, які мали нефректомію або були псевдопрооперованими. Через прогресуючий стан змін у морфології нирок, пов'язаних з односторонньою обструкцією сечоводу, потенційні гістоморфологічні ефекти лікування сотатерцептом і RAP-011 не вдалося визначити при обструкції нирок.
5. Висновки щодо доклінічного вивчення	На завершення можна сказати, що суперсімейство лігандів TGF-β, зв'язаних сотатерцептом, демонструє різноманітний вплив на ріст, розвиток і гомеостаз у численних тканинах і системах органів. Потенціал побічних ефектів був широко оцінений у доклінічних токсикологічних дослідженнях, проведених із сотатерцептом. Пошкодження нирок, що спостерігалось у щурів і макак, не поширювалося на людей у клінічних випробуваннях, проведених на сьогоднішній день. Гістоморфологічні зміни, виявлені в судинному сплетінні макак, не були пов'язані з іншими структурними змінами мозку чи поведінковими змінами та не вважалися несприятливими. У щурів вплив на вагу серця не був несприятливим і був оборотним, а зміни в виносних протоках/яєчках і наднирковій залозі навряд чи відобразяться на людині через відмінності в структурі органів (див. обговорення в короткому огляді оцінки фертильності у самців при застосуванні сотатерцепту) і моделі дозрівання відповідно. Ремодельовання надниркових залоз чутливе до змін у передачі сигналів активіну. Хоча щури сприйнятливі до змін надниркових залоз аж до дорослого віку, ремодельовання надниркових залоз людини

	завершується протягом 3-6 тижнів після народження. Сотатерцепт мав несприятливий вплив на фертильність у самців (оборотний) і самок щурів, спричиняв до- та постімплантаційну втрату, було показано, що він проникає через плаценту та спричиняє зниження маси дитинчат і пов'язані з окостенінням зміни, які були переважно оборотними в дослідженнях ембріо-фетального розвитку (EFD) і PPND у щурів і кролів (включаючи щуренят, які отримували сотатерцепт виключно через молоко). У молодих щурів сотатерцепт зменшував масу тіла та сповільнював статеве дозрівання. Інші токсичні ефекти були подібними у молодих і дорослих щурів, причому молоді тварини, як правило, більш чутливі, ніж дорослі. Нарешті, еритроїдні зміни, які спостерігалися у щурів і макак, що також спостерігалися в клінічних дослідженнях, є оборотними та не є несприятливими. Доклінічний профіль підтверджує безпечне використання сотатерцепту для лікування ЛАГ групи 1 за класифікацією ВООЗ.
Заявник (власник реєстраційного посвідчення)	_____ (підпис) <u>Одрі А. Еган (Audrey A. Egan)</u> (П. І. Б.)