トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.4 非臨床試験の概括評価

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 4
1 非臨床試験計画の概略 7
1.1 序文 7
1.2 トフェルセン 8
1.3 非臨床開発プログラム 9
1.3.1 動物種の選択 9
1.3.2 薬理試験 10
1.3.3 薬物動態試験 11
1.3.4 毒性試験 11
1.4 被験物質 13
2 薬理試験 14
2.1 効力を裏付ける試験 14
2.1.1 *In vitro* 試験 14
2.1.2 特異性 15
2.1.3 *In vivo* 15
2.1.3.1 SOD1-G93A マウスにおけるトフェルセン ICV 投与時の効力及び有効性 15
2.1.3.2 SOD1-G93A ラットにおけるトフェルセンの投与 17
2.1.3.3 カニクイザルにおけるトフェルセンの IT 投与 18
2.2 安全性薬理試験 20
2.3 要約 20
3 薬物動態試験 22
3.1 分析法 22
3.2 吸収 22
3.3 CSF 及び血漿中薬物動態並びに組織分布 23
3.3.1 単回投与後の PK 及び組織分布 23
3.3.2 反復投与後の PK 及び組織分布 23
3.3.2.1 マウスでの反復投与後の PK 24
3.3.2.2 サルでの反復投与後の PK 24
3.3.2.3 妊娠動物での PK 30
3.4 代謝 32
3.5 排泄 32
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 32
3.7 考察及び結論 33
4 毒性試験 34
4.1 単回投与毒性試験 34
4.2 反復投与毒性試験 34

4.2.1 マウス 34
4.2.2 サル 36
4.2.2.1 サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び 13 週間回復性試験 36
4.2.2.2 サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験及び 26 週間回復性試験 37
4.3 遺伝毒性試験 39
4.4 がん原性試験 39
4.5 生殖発生毒性試験 40
4.6 薬物乱用性 41
4.7 その他の毒性試験 41
4.7.1 光毒性 41
4.7.2 不純物の安全性確認 41
4.8 安全域 42
5 総括及び結論 43
6 参考文献 45
7 付録 50

略語・略号一覧表

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
2′-MOE	2′-O-(2-methoxyethyl)	2′-O-(2-メトキシエチル)
3′-UTR	3′-untranslated region	3′-非翻訳領域
aCSF	artificial cerebrospinal fluid	人工脳脊髄液
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
ALSFRS-R	ALS Functional Rating Scale-Revised	ALS 機能評価スケール改訂版
ALSoD	ALS online database	ALS オンラインデータベース
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours	投与後0時間から24時間までの濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}48h}$	area under the concentration-time curve from 0 to 48 hours	投与後0時間から48時間までの濃度時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
BLQ	below limit of quantification	定量下限未満
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
C_{max}	maximum observed concentration	最高濃度
CHL	Chinese hamster lung	チャイニーズハムスター肺
CMAP	compound muscle action potential	複合筋活動電位
CNS	central nervous system	中枢神経系
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
CYP450	cytochromes P450	シトクロム P450
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EC_{50}	half-maximal effective concentration	50%有効濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
EEG	electroencephalogram	脳波
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価
GD	gestation day	妊娠日数
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
h*ERG*	the human *ether-à-go-go-related gene*	ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子（ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子）
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
ICV	intracerebroventricular	脳室内
IT	intrathecal	髄腔内
IV	intravenous	静脈内
LC/MS	liquid chromatography/mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／質量分析
LC/MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
MATE	multidrug and toxin extrusion protein	多剤・毒性化合物排出タンパク
MDR1	multiple drug resistance protein 1	多剤耐性タンパク 1
MOE	methoxyethyl	メトキシエチル
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NMJ	neuromuscular junction	神経筋接合部
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PBPK	physiologically based pharmacokinetics	生理学的薬物速度論
PBS	10 mM phosphate sodium, 144 mM sodium chloride solution	–
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PND	postnatal day	出生後日数
pNfH	phosphoneurofilament heavy chain	リン酸化ニューロフィラメント重鎖
qRT-PCR	quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RNase	ribonuclease	リボヌクレアーゼ
SC	subcutaneous	皮下
SD	standard deviation	標準偏差
SLC	solute carrier	溶質キャリア
SOD1	superoxide dismutase 1	スーパーオキサイドジスムターゼ 1
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TK	toxicokinetic	トキシコキネティクス

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
TAM	test article mixes	不純物混合被験物質
T_{max}	time of maximal concentration	最高濃度到達時間
UV	ultraviolet	紫外線

1 非臨床試験計画の概略

1.1 序文

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、大脳皮質、脳幹、及び脊髄内の上位及び下位運動ニューロンの消失を引き起こす重篤な神経変性疾患である［Bunton-Stasyshyn 2015、Wijesekera 2009］。ALS 患者は、筋量、筋力、並びに延髄、呼吸、及び四肢筋の機能が進行性に低下し、通常、発症から 3～5 年以内に呼吸不全で死亡する［Brown 2017、Bunton-Stasyshyn 2015、Lechtzin 2018］。ALS の推定世界有病率は、10 万人当たり約 4.42 人とされている［Xu 2020］。

遺伝子標的療法など、ALS の有効な治療には、大きなアンメットニーズがある。現時点で承認されている ALS 治療薬は、リルゾール、エダラボン及びメコバラミンのみである（承認は地域によって異なる）。いずれの薬剤も明らかな疾患進行遅延・停止はみられない。リルゾールは生存期間を約 2～3 ヵ月延長させるが、筋力及び障害の改善を伴わない［Lacomblez 1996、Miller 2012］。栄養補給及び呼吸ケアを含む対症療法によって生存期間が改善する［Qureshi 2009］。エダラボンは、日本人患者を対象とした 1 試験の結果に基づき、2015 年に初めての ALS 治療薬として承認された。エダラボン投与患者では、プラセボと比較して、ベースラインからの ALS 機能評価スケール改訂版（ALSFRS-R）スコアの低下は有意に小さかったが、生存期間に対する影響は認められなかった［Writing Group and Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group 2017］。メコバラミンは 2024 年 9 月に日本で ALS の治療薬として承認された。第 III 相試験では、16 週目に ALSFRS-R に対するメチルコバラミンの中程度の影響が認められた（プラセボ投与群と比較してメコバラミン投与群を支持する 1.97 の有意差）。しかし、FVC、Norris スケール総スコア、徒手筋力テスト総スコアでは、メコバラミン投与群とプラセボ投与群間に有意差は認められなかった［Oki 2022］。ALS 治療では、疾患進行を停止又は改善、余命延長、生活の質を改善する治療薬は、依然としてアンメットニーズが存在している。

ほとんどの ALS 患者は孤発性であるが、ごく少数（約 2%）の患者は、スーパーオキサイドジスムターゼ 1（SOD1）の様々な変異を原因とする遺伝性、すなわち家族性の ALS である。1993 年に SOD1 を原因遺伝子とする ALS が最初に発見されてから、200 種類を超える SOD1 変異が ALS の原因遺伝子であることが報告されている（以下、SOD1-ALS と称する）［ALSoD 2018、Rosen 1993］。それぞれの変異型により疾患進行速度が異なっており、最も重篤な SOD1 変異では生存期間が 15 ヵ月未満である［Cudkowicz 1997、Bali 2017］。変異には、疾患の急速な進行の原因となる変異「fast mutation」と、疾患進行が緩徐な患者の他の変異「slow mutation」が存在する。

変異が SOD1-ALS を引き起こす機序は不明であるが、SOD1 活性の喪失ではなく、有害な機能の獲得が運動ニューロン死に至るカスケードを開始させることを裏付けるデータが示されている［Bruijn 1998、Rosen 1993］。SOD1 は細胞質に遍在する酵素であり、活性酸素種のスーパーオキサイドアニオンを酸素及び過酸化水素に分解する反応（不均化反応）を触媒する［Fridovich 1986］。SOD1 は非共有結合によってホモ二量体を形成する。個々の二量体は、触媒となる銅イオン及び安定化のための亜鉛を必要とする。マウスやラットに変異型 SOD1 を過剰発現させると、神経筋接合部（NMJ）における神経支配の消失や運動ニューロン死といったヒト ALS に似た症状を示す［Bruijn and Cleveland 1996、Gurney 1994］。しかし、SOD1 の欠損は運動ニューロンの機能障害を

起こすが、運動ニューロン死は起こさない［Reaume 1996、Fischer 2012］。また、SOD1-ALS のマウスモデルでは、正常な SOD1 活性の喪失又は増加のいずれも生存期間に影響しない［Bruijn 1998］。さらに、ヒトでは、個々の疾患誘発性変異は SOD1 活性レベルが異なっており、疾患誘発性変異を有する ALS 患者の一部には、SOD1 活性が見かけ上正常な患者もいる［Saccon 2013］。したがって、疾患重症度と正常な SOD1 の活性との間に相関は認められていない［Andersen 1997、Ratovitski 1999、Saccon 2013］。SOD1 の短縮型変異を 2 コピー有することにより SOD1 活性が完全に喪失している患者の乳児期及び幼児期に進行性痙性四肢不全麻痺を発症した症例が、2 件報告されている［Andersen 2019、Park 2019］。しかし、特に発生早期における SOD1 活性の喪失が、ALS でみられるものとは異なるこれらの表現型を誘発したのかどうかは不明である。これらの所見を総合すると、SOD1-ALS は変異型 SOD1 タンパク質の毒性により引き起こされることが強く示唆される。ヒトの SOD1 変異遺伝子をげっ歯類に導入したモデル（SOD1-G93A マウス又はラット）に、SOD1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を脳室内（ICV）投与して SOD1 を減少させると、生存期間が延長した［Smith 2006］。したがって、SOD1 mRNA 発現の減少及びそれによる有害な SOD1 タンパク質の減少は、SOD1-ALS 患者に治療効果をもたらすことが見込まれる。

ASO は、十分に明らかにされているワトソン・クリック型塩基対対合（ハイブリダイゼーション）を介して標的 mRNA に高親和性で選択的に結合することにより、標的 mRNA の発現を低下させるようにデザインされた短鎖合成ヌクレオチド配列である。アンチセンス技術には、従来の創薬開発法と比べて以下のような多くの利点がある。1）特異性が大幅に改善されているため、近縁の遺伝子産物間の識別が可能である。2）ASO の類似性から薬物動態（PK）、毒性、及び製造法の予測が可能である。3）転写因子、アダプタータンパク質、内因性酵素活性を有しないその他のタンパク質、又は機能不明のタンパク質といった創薬が不可能であった標的を阻害できることから汎用性に優れている［Koller 2000］。ASO は、神経性疾患、ウイルス性疾患、腫瘍性疾患、心血管疾患、代謝性疾患、炎症性疾患など、多様な疾患の治療薬として臨床試験が行われている［Chi 2005］。最近では、スピンラザが小児及び成人の脊髄性筋萎縮症の治療薬として 2017 年に承認された。さらに、現在ではヒトに ASO（SOD1 ASO を含む）を髄腔内（IT）投与した経験もあり、IT 投与は中枢へ ASO を送達する効率的かつ忍容性の高い投与法であることが示唆されている［Miller 2013］。

トフェルセンは、ワトソン・クリック型塩基対対合によりヒト SOD1 mRNA の 3′-非翻訳領域（3′-UTR）に相補的に結合する。トフェルセンが SOD1 mRNA に結合すると、リボヌクレアーゼ（RNase）H1 を介して SOD1 mRNA が分解され、これにより SOD1 タンパク質の合成量は減少する。RNase H1 は偏在的に発現する酵素（ヌクレアーゼ）であり、DNA-RNA ヘテロ二本鎖を認識して二本鎖の RNA 鎖を切断する［Dirksen 1981、Lima 2007］。トフェルセンはヒト SOD1 mRNA の 3′-UTR に結合するため、野生型及び変異型両方の SOD1 の発現を減少させることが期待される。

1.2 トフェルセン

トフェルセンは、第 2 世代キメラ混合型の基本骨格を有する ASO である。本薬は 20 塩基（20-mer）オリゴヌクレオチドであり、15 のホスホロチオエートジエステル結合及び 4 つのホスホジエステ

ル結合を有する。20 の糖残基のうち 10 個は 2′-デオキシ-D-リボース（2′-デオキシヌクレオシド、DNA）、残りは 2′-O-(2-メトキシエチル)-D-リボースを配する。10 個の DNA ヌクレオチドに隣接する分子の 5′及び 3′末端にそれぞれ 5 個の 2′-O-(2-メトキシエチル)ヌクレオシドが配列されている。シトシン及びウリジン塩基はすべて 5′位がメチル化されている。

トフェルセンの核酸配列は以下のように表記される。

5′ -^{Me}CsAoGsGoAsTsAs^{Me}CsAsTsTsTs^{Me}CsTsAs^{Me}CoAsGo^{Me}Cs^{Me}U- 3′

下線で示す残基は 2′-MOE ヌクレオシドである。s 及び o はそれぞれホスホロチオエート及びホスホジエステル結合の位置を示す。

分子式を以下に示す。

$C_{230}H_{317}N_{72}O_{123}P_{19}S_{15}$（遊離酸）；分子量は 7127.86 amu

1.3 非臨床開発プログラム

トフェルセンの非臨床プログラムでは、SOD1 遺伝子変異と関連する ALS の治療を目的とする長期 IT 投与をサポートする *in vitro* 及び *in vivo* 試験を広範に実施した。トフェルセンの非臨床開発計画は、医薬品に典型的な開発経路で既存のガイドライン ICH M3(R2)［ICH 2012］に従った。非臨床プログラムの目的は、以下のとおり、トフェルセンの薬理、PK、及び安全性を評価することであった。

- 薬理試験 : トランスジェニックマウス及びトランスジェニックラットモデル並びにサルを用いて SOD1 減少作用を評価すること。
- PK 試験 : 患者における IT 投与頻度の推定に活用するために、中枢神経系（CNS）組織におけるトフェルセンの消失半減期（$t_{1/2}$）を評価すること、また、薬理及び毒性試験動物における ASO の脳脊髄液（CSF）中濃度と組織中濃度との関連性を検討すること。
- 安全性薬理試験及び毒性試験（GLP 適用）: ALS 患者の治療を目的としたトフェルセンの長期使用をサポートすること。

1.3.1 動物種の選択

毒性試験は、CD-1 マウス、Sprague Dawley（SD）ラット、New Zealand White（NZW）ウサギ、及びカニクイザルを用いて実施した。反復 IT 投与毒性試験の主要動物種としてカニクイザルを選択した主な理由は 2 つある。第一に、静脈内（IV）投与又は皮下（SC）投与を用いた他の ASO のプログラムから、ASO の組織分布、細胞への取込み、代謝、及びクラス毒性（炎症誘発作用等）の感受性に関して、サルはヒトに最も類似していることである［Henry 2008］。第二に、他の標準的な毒性試験動物種と比較して、サルは神経解剖学的にヒトに近いため、反復腰髄 IT 投与が可能で IT 投与後のヒトにおける薬物分布のモデリングが可能なことである。さらに、サルはヒト SOD1 配列との相同性が最も高いため（1 塩基対ミスマッチ）、本薬では特に適切な毒性試験動物種である。サルでは、トフェルセンの IT 投与により SOD1 濃度の低下が認められている。したがって、サルでは、予定臨床投与経路（腰髄 IT 投与）で本薬を反復投与することが可能であるため、患者への IT 投与の安全性及び曝露に関する最も適切な情報が得られる。

マウスを用いた反復 SC 投与慢性毒性試験では、ハイブリダイゼーションに関連しない影響を評価した。

トフェルセンは、マウス SOD1 に対して 7 塩基対のミスマッチがあるため、マウスの SOD1 発現を阻害しない。しかし、臨床試験で予定されている投与スケジュールでの IT 投与には技術的に限界があるため、高用量による全身作用を SC 投与で評価するためにマウスを選択した。げっ歯類は霊長類と比較して 2′-MOE ASO の炎症誘発作用に対する感受性が高いため、IT 又は ICV 投与による忍容性の臨床的意義についても限界がある。げっ歯類を用いて臨床投与経路（腰髄 IT 投与）での局所投与の影響を評価するため、ラットを用いた単回投与毒性試験を実施した。トフェルセンは、ラット SOD1 に対して 6 塩基対のミスマッチがある。

1.3.2 薬理試験

非臨床薬理試験では、トフェルセンの有効性及び選択性を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。*In vitro* 試験において、トフェルセンは 2 種のヒト細胞株及びカニクイザルの初代培養肝細胞の SOD1 mRNA 量を減少させた。トフェルセンの一次配列に基づくオフターゲット候補遺伝子を同定するため、バイオインフォマティクス解析を実施した。*In silico* で予測されたオフターゲット候補遺伝子は、CNS では発現がみられない、トフェルセンにより *in vitro* での発現が減少しない、又はヒト細胞におけるトフェルセンの mRNA 減少作用がオンターゲットである SOD1 mRNA 減少作用と比較して非常に弱い（50%阻害濃度［IC_{50}］が 100 倍超）のいずれかに該当した。CNS に発現していない 7 つのオフターゲット候補遺伝子の 1 つである MIR4435-2HG は、この lncRNA（long noncoding RNA）量の増加と好酸球増加症候群の関連が報告されているが［Kotzin 2016］、一部の末梢組織で弱い発現がみられたのみであった。

トフェルセンの *in vivo* における薬理作用は、ヒト SOD1 変異遺伝子（SOD1-G93A）を過剰発現させたトランスジェニックマウス、トランスジェニックラット及びカニクイザルで確認した。トフェルセンの ICV 投与は、SOD1-G93A マウスの腰髄のヒト SOD1 mRNA を減少させ、50%有効濃度（EC_{50}）は約 1 μg/g であった。SOD1-G93A マウスでは、臨床でみられる生存期間の短縮、運動障害、及びいくつかの病理組織学的変化が認められるが、トフェルセンの投与によりこれらの症状や変化が改善された。SOD1-G93A ラットにトフェルセンを IT 投与すると、マウスと同様に SOD1 mRNA 量の用量依存的な減少が認められた。トフェルセンの単回 IT 投与及び ICV 投与はいずれも、ラット CNS における SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度の減少が少なくとも投与 8 週後まで認められ、作用の持続性はトフェルセンの長い半減期と一致していた。SOD1-G93A ラットにおける CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の減少も投与 8 週後まで認められた。トフェルセンを投与したカニクイザルでは、CNS 全体で用量依存的な SOD1 mRNA 量の減少が認められた。ラットと同様に、CSF 中 SOD1 タンパク質濃度は減少し、最終投与後 13 週以上にわたりその減少が持続した。

中枢神経系、呼吸系及び心血管系への影響に関する安全性薬理評価は、ラット単回投与試験並びにカニクイザル 13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験で行った。ラットでは、トフェルセン 3 mg 投与群（1500 mg ヒト等価用量［HED］）で覚醒、歩行、自発運動、呼吸及び感覚運動の低下が認められた。サルでは、評価したいずれの安全性薬理評価項目にも影響は認められなかった。また、トフェルセンが心臓の I_{Kr}（ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子［h*ERG*］カリウムチャネル）を阻害す

る可能性は極めて低い（IC_{50} > 34 μM）ことが示された。

1.3.3 薬物動態試験

トフェルセン IT 投与後のカニクイザルの CSF、血漿及び組織、並びに SC 投与後のマウスの血漿及び組織を用いて、PK プロファイルを評価した。これらの PK 試験の目的は以下のとおりであった。

- トフェルセン IT 投与後の CSF 及び血漿中曝露量、CNS 及び全身組織中曝露量、並びにそれらの関連性の検討
- ALS 患者での投与頻度の設定根拠を得るための、CSF、血漿、CNS 及び全身組織における $t_{1/2}$ の推定
- 薬理試験で有効性が認められた組織中濃度範囲をサルの CNS 組織で達成するために必要な投与量の確認

タンパク結合、代謝物の同定、及びシトクロム P450（CYP450）の阻害及び誘導を含む薬物間相互作用の可能性を評価するために、以下の試験も実施した。

- マウス、サル及びヒトの血漿中におけるトフェルセンのタンパク結合の検討
- マウス及びサルの組織（肝臓及び腎臓）におけるトフェルセンの代謝物の同定
- トフェルセンの CYP450 による酸化的代謝の誘導作用及び阻害作用、並びに取り込み及び排出トランスポーターの阻害作用及び基質性の評価

関連する PK 試験の概要を 2.6.4 表 13 に記載する。

サルへの IT 投与による CSF 中のトフェルセン濃度は、多相性に低下し、急速な分布相（CSF からのクリアランスが大部分を占めた）に続くより緩徐で持続的な消失相を伴っていた。急速な分布相は、CSF から CNS 組織への迅速で広範な分布によるものであり、これには全身循環への移行によるさらなるクリアランスも含まれている。CSF 中の推定終末相 $t_{1/2}$ は 20～45 日であり、CNS 組織中の推定 $t_{1/2}$（31～40 日）と同程度であった。血漿中トフェルセン濃度は、IT ボーラス投与後 1～4 時間にピークに達し、投与後 48 時間以内に急速に低下し、その後、より緩徐な消失相を示した。血漿中濃度の急速な低下は、主に全身組織への広範な分布によるものである。血漿中濃度の推定 $t_{1/2}$ は 22～51 日であり、CSF 及び CNS 組織と同程度であった。

評価したすべての動物種（サル、マウス及びラット）でトフェルセンの用量依存的な組織分布が確認され、CNS と末梢組織における組織分布の性差を示す明確な又は一貫した証拠は認められなかった。サルに IT 投与後、トフェルセンは CNS 組織に広く分布した。最も高濃度を示した組織は腰髄であった。肝臓及び腎臓で比較的高濃度を示しており、投与されたトフェルセンが高い割合で CSF から全身循環中に分布したことが示された。サルと同様に、ラットに IT 投与後、トフェルセンは CNS 組織に広く分布した。

1.3.4 毒性試験

主要な非臨床毒性試験は、ICH M3(R2)［ICH 2021］及び ICH S6(R1)［ICH 2011］ガイドラインに従い、GLP 適用で実施した。試験の一覧を以下に示す。

- SD ラットを用いた単回 IT 投与毒性試験（GLP 適用、666853-AS03 試験）
- CD-1 マウスを用いた 12 週間反復 SC 投与毒性試験（GLP 適用、666853-AS02 試験）
- CD-1 マウスを用いた 26 週間反復 SC 投与毒性試験及び 8 週間回復性試験（GLP 適用、P067-[redacted]-03 試験）
- カニクイザルを用いた腰髄 IT ボーラス投与による用量漸増忍容性、薬物動態、及び薬力学スクリーニング試験（GLP 非適用、SOD1-RS01 試験）
- カニクイザルを用いた 13 週間反復 IT 投与毒性試験及び 13 週間回復性試験（GLP 適用、666853-AS01 試験）
- カニクイザルを用いた 39 週間反復 IT 投与毒性試験及び 26 週間回復性試験（GLP 適用、P067-[redacted]-01 試験）
- CD-1 マウス（GLP 適用、P067-17-02 及び P067-[redacted]-01 試験）及び NZW ウサギ（GLP 適用、P067-17-05 試験）を用いた生殖発生毒性試験
- 遺伝毒性試験（GLP 適用、試験番号 666853-IS01、666853-IS02、及び P067-19-02 試験）
- カニクイザルを用いた 13 週間反復 IT 投与不純物安全性確認試験（GLP 適用、P067-[redacted]-06 試験）

反復投与毒性試験で使用した ASO 原薬ロット（[redacted] 及び [redacted]）は、初期の臨床試験（233AS101、233AS102、及び 233HV101 試験）でも使用した。

予定対象患者集団を考慮して、マウスを用いた反復 SC 投与毒性試験、サルを用いた反復 IT 投与毒性試験を実施した。マウスを用いた反復投与毒性試験の最高用量（150 mg/kg）は、肝臓及び腎臓などの組織への薬物の取込み、並びに蓄積に関連した影響を誘発し、末梢の潜在的な毒性標的器官を明らかにする目的で設定した。高用量における血漿中曝露量は、ヒトの治療で予想される全身曝露量を上回ることが予測される。サルを用いた反復投与毒性試験の最高用量（35 mg）は、サルを用いた単回 IT 投与毒性試験（GLP 非適用）の 60 mg 群で認められた急性忍容性所見による限界量であった。トフェルセンに関連した神経学的所見として、有害で重度の一般状態変化がみられ、神経学的所見を軽減するためにジアゼパム投与が必要であった。サルを用いた反復投与毒性試験では、曝露量を最大にするために、臨床投与レジメンに合わせて曝露量を最大にするため、負荷投与及び維持投与レジメンを用いた。

トフェルセンの遺伝毒性は、細菌を用いた復帰突然変異試験及び CHL 細胞株を用いた染色体異常試験による *in vitro* 評価、並びにマウス小核試験による *in vivo* 評価を行った。遺伝毒性試験結果はいずれも陰性であった。

サルを用いた反復 IT 投与毒性試験の結果、免疫及び内分泌機能障害は認められなかった。さらに、マウス（12 及び 26 週間）又はサル（13 及び 39 週間）試験の結果、前がん病変、及び腫瘍性病変は認められなかったことから、トフェルセンに増殖性作用は認められなかった。

生殖発生毒性試験は、マウス（受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験、並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験）及びウサギ（胚・胎児発生に関する試験）を用いて、最大の全身曝露量を得るために SC 投与により実施した。

さらに、製造工程由来及び原料由来不純物を増量した原薬を用いて、13 週間反復 IT 投与不純物安全性確認試験をサルで実施した。

26 週間（マウス）及び 39 週間（サル）反復投与毒性試験の無毒性量は、ALS 患者を対象とした申請用法・用量（負荷投与期の最初の 1 ヵ月間は 2 週間に 1 回投与、その後の維持投与期は 1 ヵ月に 1 回投与）に対して十分な安全域がある。サル 39 週間反復投与毒性試験における無毒性量は 12 mg と判断され、サル対ヒトの CSF 量比が 10 倍の CSF 量換算により HED は 120 mg となり、この HED は 100 mg のヒト用量に対して 1.2 倍の安全域がある。非臨床安全性プログラム全体から、ALS の治療を目的としたトフェルセンの承認申請をサポートする適切な安全性データが得られている。

1.4 被験物質

被験物質であるトフェルセンは、製剤を調製せずに投与液として供試（ラット及びサル）、あるいは人工脳脊髄液（aCSF）（サル）又は PBS（マウス及びウサギ）を用いて調製して投与液とした。被験物質のロットの一覧を付録 1 に示す。

2 薬理試験

薬理試験ではトフェルセンの SOD1 mRNA 分解促進作用（減少作用）の有効性及び選択性を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価した。ヒト及びカニクイザルの細胞を用いた *in vitro* 試験において、トフェルセンは SOD1 mRNA 量を濃度依存的かつ選択的に減少させた。ヒト SOD1（SOD1-G93A 変異）遺伝子を発現させた 2 種のげっ歯類の ALS 病態モデル及びカニクイザルを用いた *in vivo* 試験を実施した。薬理作用を得るために必要な CNS 組織中トフェルセンの最小有効濃度及び至適濃度をこれらの *in vivo* 試験で評価した。

2.1 効力を裏付ける試験

2.1.1 *In vitro* 試験

トフェルセンは、最初に *in vitro* の SOD1 mRNA 量の減少作用を指標にした約 2000 の単一濃度のオリゴヌクレオチドのスクリーニングから同定された。2 種のヒト細胞株（神経芽腫細胞株 SH-SY5Y 及び上皮癌由来細胞株 A431）を用いて、SOD1 mRNA 量に及ぼす漸増濃度のオリゴヌクレオチドによる影響を評価し、トフェルセンの *in vitro* での効力を確認した。トフェルセンは両細胞株で SOD1 mRNA 量を濃度依存的に減少させ、IC_{50} は SH-SY5Y 細胞で 1.1 μM、A431 細胞で 0.65 μM であった（2.6.2.2.2 項）。陰性対照オリゴヌクレオチドはいずれの細胞株においても SOD1 mRNA 量の減少作用を示さなかった。これらの結果より、トフェルセンは *in vitro* において、ヒト SOD1 mRNA 量を効果的に減少させることが示された。

トフェルセンの結合部位はワトソン・クリック塩基対対合に基づいており、標的配列はヒト SOD1 mRNA の 3′-UTR に位置している。SOD1 遺伝子の標的結合部位における多型をヒト一般集団、特に ALS 患者の変異データベースにより調査した。トフェルセンの結合部位に多型は確認されなかったことから、トフェルセンはヒト集団において保存されている SOD1 遺伝子の配列を標的としており、ALS 関連変異を含むすべてのヒト SOD1 mRNA に対して広範な作用を示すことが示唆された。

ヒト以外の動物種の SOD1 mRNA に対するトフェルセンの交差反応性を評価するため、一連のインフォマティクス解析を実施した。マウス及びラットでは、4 つ以下のミスマッチを有するトフェルセンの標的候補は確認されなかったことから、トフェルセンがマウス又はラットの SOD1 mRNA に活性を示す可能性は低いことが示された。一方、カニクイザル SOD1 配列との比較ではミスマッチ塩基対は一つしかみられなかった。トフェルセンがサル SOD1 と交差反応性を示す場合は *in vivo* の安全性試験において、サルを用いたオンターゲット毒性の評価が可能と考えられることから、カニクイザル SOD1 に対するトフェルセンの作用を *in vitro* 及び *in vivo* で評価した。その結果、ヒト細胞株を用いた実験と同様に、トフェルセンはサル肝細胞の SOD1 mRNA 量を濃度依存的に減少させ、その IC_{50} は 0.98 μM であった（2.6.2.2.2 項）。陰性対照オリゴヌクレオチドは SOD1 mRNA 量を変化させなかった。以上のことから、サルはトフェルセンのオンターゲット作用の評価に適した非臨床試験動物種であると考えられた。

2.1.2 特異性

トフェルセンのオフターゲット候補遺伝子を同定するため、20[redacted] 年に最初のヒトトランスクリプトームによる *in silico* 解析を実施し、20[redacted] 年に最新のトランスクリプトーム解析及びアラインメント基準を設定して解析を更新した。ASO の特異性はその一次配列により決定づけられ、オリゴヌクレオチドは完全には一致していない遺伝子を抑制する場合があるものの、その効力はミスマッチにより急激に減弱する。トフェルセンのような ASO は、3 つ以上のミスマッチ、挿入、及び／又は欠失を有する標的配列に対して明らかな活性を示す可能性は非常に低い［Yoshida 2019］。トフェルセンの一次配列に基づき、バイオインフォマティクス解析でオフターゲット候補遺伝子を特定したところ、0 又は 1 つのミスマッチ、挿入、及び／又は欠失を有する遺伝子は SOD1 mRNA 以外には認められなかった。2 つのミスマッチ、欠失、及び／又は挿入を有する遺伝子が 27 個みられた（2.6.2.3.2 項及び 2.6.2.3.3 項）。オフターゲット候補遺伝子のうち 7 個はヒト CNS には発現しておらず、そのうち lncRNA である MIR4435-2HG は、好酸球増加症候群との関連が報告されている［Kotzin 2016］が、一部の末梢組織では弱い発現がみられたのみであった。同定された残り 20 のオフターゲット候補遺伝子の RNA に対するトフェルセンの作用を、SH-SY5Y 細胞、iCell 神経細胞又は A431 細胞を用いて、SOD1 mRNA に対する作用と比較し、その効力を測定した。残り 20 のオフターゲット候補遺伝子のヒト細胞における発現は、トフェルセンにより低下しない、又はトフェルセンの低下作用はオンターゲットの SOD1 mRNA 減少作用と比較して非常に弱かった（IC_{50} 値が 100 倍超）（2.6.2.3.2 項及び 2.6.2.3.3 項）。以上のことから、トフェルセンは他のヒト RNA と比較して SOD1 mRNA に高い選択性を有することが期待できる。

2.1.3 *In vivo*

In vivo で実施した薬理試験は 2 種類に大別できる。 1 つは、トフェルセン投与と SOD1 mRNA 量又はタンパク質濃度減少作用における頑健な PK/PD 相関の確立であり、もう 1 つは ALS 病態モデルを用いたトフェルセンの投与方法の違いによる効果の違いの検討である。野生型のマウス及びラットでは、トフェルセンの標的結合部位である SOD1 mRNA の 3′-UTR は保存されていないため、薬効評価には 3′-UTR を含む完全なヒト SOD1（SOD1-G93A）を導入したトランスジェニック動物を用いた。また、トフェルセンの PK/PD 相関は、主にカニクイザルの 13 週間反復投与毒性試験で検討した。

トフェルセンは全身投与しても血液脳関門を通過できないことから、CNS でのノックダウン効果を得るためには、IT 又は ICV 投与が必要である。マウスでの IT 投与は技術的に困難であることから、マウスでは ICV 投与が適切な投与経路である。より大型モデル動物のラットやサルは IT 投与及び濃度測定用の CSF 採取に適している。

2.1.3.1 SOD1-G93A マウスにおけるトフェルセン ICV 投与時の効力及び有効性

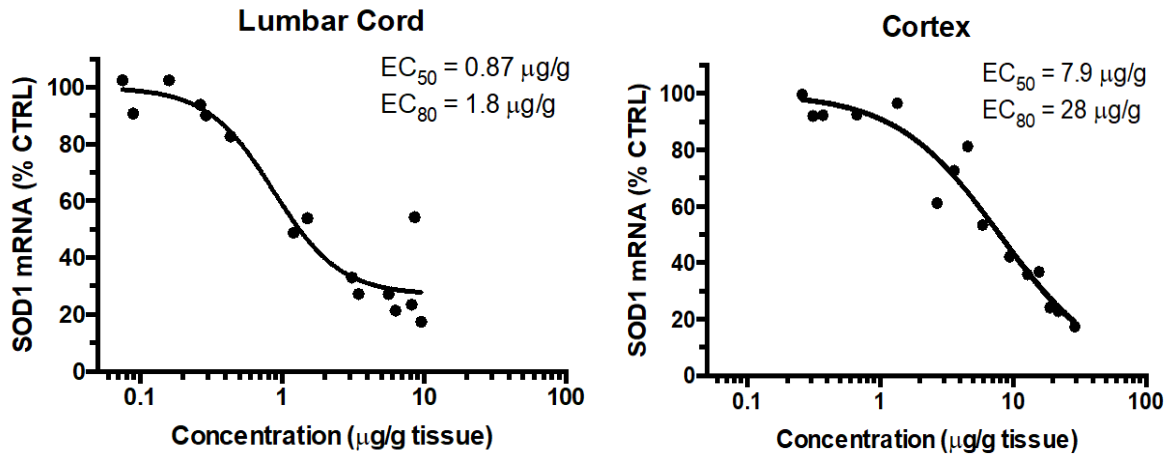
In vivo における効力及び有効性を確認するため、トフェルセンの標的となる 3′-UTR を含むヒト SOD1 遺伝子（SOD1-G93A）を発現するトランスジェニックマウス［Gurney 1994］を使用した。本マウスは約 18 コピーのヒト SOD1 遺伝子を有し、SOD1 mRNA 及び SOD1 タンパク質を過剰に発現している。しかし、SOD1 遺伝子の発現パターンは、主に内因性の SOD1 遺伝子の発現パターンを反映したものである。本マウスは、脊髄運動ニューロン死及び前根（運動神経根）の

有髄軸索の消失といったALSの病理組織学的特徴を示し、最終的に筋萎縮及び麻痺を引き起こす。また、SOD1 及びユビキチンを含む細胞質内凝集体の蓄積、変性した運動ニューロンにおける異常なニューロフィラメントの蓄積、並びに脊髄及び脳における反応性アストログリア及びミクログリアの存在が認められている。

SOD1-G93Aマウスに種々の用量のトフェルセンを単回ボーラスでICV投与した。2週後に腰髄、頸髄、及び大脳皮質を採取し、ヒト SOD1 mRNA 量を定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法で、トフェルセン濃度をハイブリダイゼーション酵素免疫測定（ELISA）法で定量した。検討した全組織の SOD1 mRNA 量は、用量依存的に減少し、EC_{50} は腰髄で 0.87 µg/g、大脳皮質で 7.9 µg/g であった（図 1）。腰髄における EC_{50} は、ヒトで効果を発揮するために CNS で到達すべき組織内濃度として特に重要である。したがって、腰髄における EC_{50}（0.87 µg/g）の近似値（1 µg/g）を CNS における目標曝露濃度と推定した。

図 1　　SOD1-G93A トランスジェニックマウスにおけるトフェルセンの ICV 投与時の濃度反応曲線

a)　　b)



トフェルセンの ICV ボーラス投与後の EC_{50} は、(a) 腰髄で 0.87 µg/g、(b) 大脳皮質で 7.9 µg/g であった。ヒト SOD 1 mRNA は、ハウスキーピング遺伝子のシクロフィリン mRNA を内部標準として用い、対照（PBS）投与群に対する割合として示した。プロットは個々の動物の値を表す。濃度-反応曲線は、非線形回帰分析でフィットさせた。
Data source: M4.2.1.1-3_Figure 2

SOD1-G93A マウスは SOD1-ALS 患者で認められる表現型と類似していることから、SOD1-G93A マウスにトフェルセンを ICV 投与し、生存期間や運動機能の評価試験、組織学的、及び生化学的試験を実施した。結果を以下に要約する。

- 投与時期に関係なく、疾患発症までの時間及び生存期間の延長（2.6.2.2.4 項）。
- 運動機能（ロータロッド上におけるマウスの滞在時間の測定）の改善（2.6.2.2.5 項）。
- 前脛骨筋の機能及び神経支配（複合筋活動電位［CMAP］及び NMJ 数の測定）の改善並びに筋萎縮（筋線維径の測定）の抑制（2.6.2.2.6 項及び 2.6.2.2.8 項）。
- ヒラメ筋の脱神経による線維型転換（遅筋型ミオシン陽性線維の割合の測定）の保護（2.6.2.2.7 項）。
- 脊髄における炎症（ミクログリアマーカーの IBA-1 による染色）の軽減（2.6.2.2.7 項）。

- 大脳皮質及び腰髄における野生型及びミスフォールド SOD1 タンパク質濃度の用量依存的な減少（2.6.2.2.8 項）。
- CNS 神経変性の新規マーカーである血清中リン酸化ニューロフィラメント重鎖（pNfH）濃度の用量依存的な低下（2.6.2.2.8 項）。

以上のように、トフェルセンの ICV 投与により、SOD1-G93A マウスの生存期間の延長、生理学的機能の改善、及び疾患進行の抑制が認められた。

2.1.3.2 SOD1-G93A ラットにおけるトフェルセンの投与

SOD1-G93A ラットにトフェルセンを IT 又は ICV 投与したときのトフェルセンの用量と、SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度並びに効果持続時間の関係を検討した。このラットモデルは、SOD1-G93A マウスと同様に、トフェルセン結合部位である 3′-UTR を含む完全長の G93A 変異のヒト SOD1 遺伝子を高レベルで発現している［Howland 2002］。この試験において、ラットモデルを使用したのは、ラットはマウスと比較してサイズが大きく、CSF サンプルの採取が容易であるためであった。CSF 中の SOD 1 の測定は有用な PD マーカーとなる可能性があるため、CSF を採取して測定できることが重要であった。

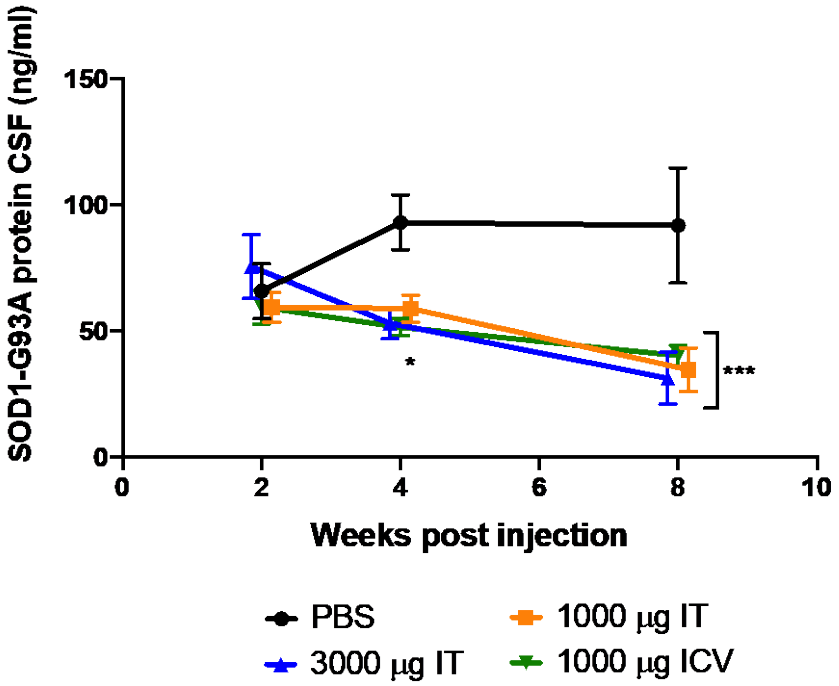
SOD1-G93A ラットにおけるトフェルセンの効力を調べるため、異なる用量のトフェルセンを単回 IT ボーラス投与し、その 2 週後に CNS 組織を採取して、qRT-PCR により組織中の SOD1 mRNA 量を、また、ハイブリダイゼーション ELISA によりトフェルセン濃度を測定した。その結果、トフェルセンの SOD1 mRNA 量減少作用の EC_{50} は腰髄で 1.4 µg/g、頸髄で 2.3 µg/g であり、その作用は SOD1-G93A マウスモデルと同程度であった（2.6.2.2.9 項）。

SOD1-G93A ラットにトフェルセンを単回 IT（1000 又は 3000 µg）又は ICV（1000 µg）ボーラス投与し、CNS 及び CSF における SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度減少作用の持続時間を測定した。投与 2、4、又は 8 週後に組織を採取し、組織中 SOD1 mRNA 量又は SOD1 タンパク質濃度を測定した。その結果、3 投与群すべてで、平均で 50%以上の腰髄 SOD1 mRNA 量の減少が認められ、修飾オリゴヌクレオチドの組織内クリアランスが緩徐であることに一致して、少なくとも投与 8 週後まで作用が持続した（2.6.2.2.10 項、図 23A、図 24A、及び図 25A）。低用量での IT 投与 8 週後の大脳皮質を除き、3 投与群すべてで頸髄及び大脳皮質吻側部における SOD1 mRNA 量の有意な減少が認められた（2.6.2.2.10 項、図 23、図 24、及び図 25）。ヒト SOD1 に特異的な ELISA を用いて SOD1-G93A タンパク質濃度を定量した結果、3 領域すべてでトフェルセン投与により SOD1 タンパク質濃度が減少した。腰髄において、高用量で IT 投与したときは、すべての時点において SOD1 タンパク質濃度の減少が認められたが、1000 µg で SOD1 タンパク質濃度の減少がみられたのは投与 2 及び 4 週後のみであった（2.6.2.2.10 項、図 26）。ICV 投与では腰髄において SOD1 タンパク質濃度の有意な減少は認められなかった。頸髄では、用量及び投与経路にかかわらず、すべての時点において SOD1 タンパク質濃度の有意な減少が認められた（2.6.2.2.10 項、図 27）。大脳皮質では、トフェルセンのいずれの投与経路及び用量においても、投与 8 週後に SOD1 タンパク質濃度の減少が認められた（2.6.2.2.10 項、図 28）。投与 2 週後には ICV 投与群のみで SOD1 タンパク質濃度の減少が認められた。

組織中における標的抑制の間接的指標としての CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の有用性を評価す

るために、SOD1-G93A ラットから CSF を採取した。1000 µg ICV 投与群では投与 4 週後に、全群で投与 8 週後には統計学的に有意な SOD1 タンパク質濃度の減少が認められた（図 2）。トフェルセン投与動物における SOD1 タンパク質濃度は、いずれも溶媒投与群と比較して約 50%低かった。

図 2　　トフェルセン IT 又は ICV 投与後の CSF 中 SOD1 タンパク質濃度



SOD1-G93A ラットにトフェルセンを IT ボーラス（1000 及び 3000 µg）又は ICV ボーラス（1000 µg）投与した 8 週後における CSF 中 SOD1 タンパク質濃度は、PBS 投与群と比較して減少した。
SOD1 タンパク質濃度は ng/mL で表す（平均値 ± 標準誤差、n = 11～41）。3 つの投与群のデータをまとめて示す。mRNA で ROUT 解析により除外された外れ値は群平均には含めなかった。データは見やすいようにずらして配置している。
PBS 群に対する有意差：*p < 0.05（投与 4 週後の 1000 µg ICV 投与群）、***p < 0.001（投与 8 週後の全群）、二元配置分散分析後に Dunnett の多重比較検定を行った。
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 7

SOD1-G93A ラットの成績から、トフェルセンの単回投与はラットにおける複数の CNS 領域で SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度の両方を長期間にわたり減少させることが示された。さらに、組織におけるこれらの変化は CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の変化として反映される。

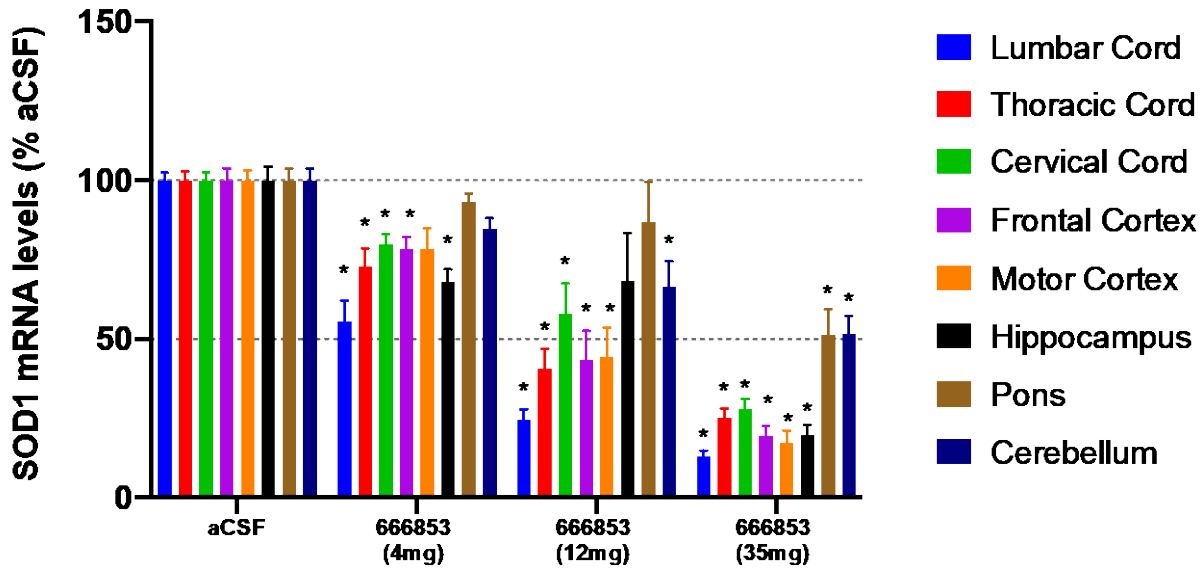
2.1.3.3　　カニクイザルにおけるトフェルセンの IT 投与

げっ歯類を用いた試験の限界の 1 つは、ヒトと比較して動物のサイズが小さいことであり、CNS の各領域における標的のノックダウンを評価することは困難である。一方、サルは組織分布、細胞への取込み、代謝、及び炎症誘発作用などの ASO のクラス毒性に対する感受性がヒトに最も類似している。さらに、サルの神経解剖学的構造は、他の非臨床試験動物種よりもヒトに近い。トフェルセンは、一塩基対のミスマッチがあるにもかかわらず、カニクイザル SOD 1 に対して活性を示すことから、サルを用いたトフェルセンの試験は、CNS の様々な領域における SOD1 mRNA の相対的なノックダウンを評価し、組織中濃度と CSF 中タンパク質濃度との関係を探索する上で重要な機会となる。投与経路は、臨床投与経路と同じ IT 投与を選択した。

トフェルセンの PK/PD 相関をカニクイザル 13 週間反復 IT 投与毒性及び PK 試験（GLP 適用）で検討した（666853-AS01 試験）。この GLP 試験の主な目的は、腰髄 IT ボーラス投与による局所及び全身毒性を評価し、その後の休薬期間での回復性又は遅発性の所見の有無を評価することであった。トフェルセン 0、4、12、及び 35 mg の腰髄 IT ボーラス投与を、最初の 1 ヵ月間は隔週（1、14、及び 28 日目）、その後は月 1 回（56 及び 84 日目）で投与した。回復群を設け、最終投与から 13 週間動物に投与を行わなかった（追加の 35 mg 投与群）。

最終投与から 1 週間後の 91 日目において、脊髄及び運動野といった ALS に最も関連の深い組織を含む CNS 組織全般で、トフェルセン投与により用量依存的に SOD1 mRNA 量を減少させた（図 3）。検討した組織のうち、橋及び小脳での減少の程度は弱く、高用量のみ有意な減少が認められた。

図 3　　カニクイザルにおけるトフェルセン投与時の SOD1 mRNA 量



カニクイザルに aCSF（人工 CSF）又は 4、12、及び 35 mg のトフェルセンを 13 週間で計 5 回 IT ボーラス投与した。最終投与 1 週後に組織検体を採取し、組織中 SOD1 mRNA のノックダウンを検討した。内標としてシクロフィリン A mRNA を用い、aCSF 群の値を 100 としたときの割合（%）で示した（投与群間の検定は二元配置分散分析後、Dunnett の多重比較検定［aCSF との比較］：*$p < 0.05$、$n = 6$）。
Lumber Cord：腰髄、Thoracic Cord：胸髄、Cervical Cord：頚髄、Frontal Cortex：前頭皮質、Motor Cortex：運動野、Hippocampus：海馬、Pons：橋、Cerebellum：小脳
Data source: M4.2.3.2-4_mRNA Phase Report_Figure 1

トフェルセンは、培養肝細胞においてカニクイザルの SOD1 に対する強力な作用を示し（2.6.2.2.2 項、図 4）、*in vivo* の効力は、CNS 各領域での薬物濃度と SOD1 mRNA 量の相関（PK/PD 相関）を調べることによって推定可能である。PK/PD 解析ではすべての投与群の CNS 組織をプールした。解析に用いた CNS 組織には、腰髄、胸髄、頚髄、大脳皮質、小脳、橋、及び海馬を含めた。

その結果、カニクイザル SOD1 に対する EC_{50} は 20.7 µg/g と推定され、トランスジェニックマウスの EC_{50} の 10 倍以上低下することが示唆された（2.6.2.2.11 項、図 31）。トランスジェニックマウスとサルの間で効力に差がみられた理由は不明であるが、一部はサルとヒトで SOD1 mRNA の配列が異なっている（1 組のミスマッチ塩基対）ことに起因すると考えられる。

組織中薬物濃度及び mRNA 量を用いた PK／PD 相関の検討のほかに、サルの試験では、標的ノックダウンの間接的マーカーとして CSF 中 SOD1 タンパク質濃度を評価した。トフェルセンを投与したカニクイザルの CSF を検討したところ、最終剖検時（91 日目）では、SOD1 タンパク質濃度が投与前と比較して減少していた。減少の程度は概して用量に依存して増加する傾向がみられ、明らかにヘモグロビンが混入した動物を解析から除外するとこの変化はより顕著に認められた。これは、腰椎穿刺時の外傷時に SOD1 を発現している赤血球が混在することにより SOD1 タンパク質濃度増加の誤った結果が得られる場合がある［Seehusen 2003］ためである。さらに、CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の減少は、35 mg の投与を受けた回復群のサル（175 日目）でも引き続き認められた。

以上の成績から、CSF 中 SOD1 タンパク質濃度は CNS 組織内 SOD1 減少のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。

2.2 安全性薬理試験

トフェルセンが心臓の I_{Kr}（h*ERG* チャネル）を阻害する可能性は極めて低いことが示された（$IC_{50} > 34$ μM）（2.6.2.4.1 項）。

ラットを用いた単回投与毒性試験及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で安全性薬理パラメータを観察した。心血管系評価（心電図［ECG］、心拍数、及び血圧）、呼吸系評価（呼吸数及び血液ガス）、及び神経学的検査（一般感覚、運動機能、反射、及び体温）を行った。ラットでは、高用量群の投与後約 3 時間以内に一過性の急性触覚過敏、並びに覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の低下が認められた。サルでは、反復 IT 投与後の心血管系、呼吸及び体温にトフェルセンの影響は認められなかった。サルに 12 mg/回を超える用量で IT ボーラス投与したとき、投与 4 時間後に脊髄反射の一過性の低下が認められたが、投与 8 時間後までに消失した（詳細は 2.6.6 参照）。13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験における一般神経学的検査（一般感覚、運動機能、及び反射）の結果は、39 週間反復投与毒性試験における 35 mg 群の雌 1 例に神経症状（一過性の筋痙攣及び間欠性振戦）が発現したことを除き、正常であった。この動物の脳波（EEG）から、EEG 測定中の筋痙攣は発作（seizure）ではなく覚醒に関連していた可能性が確認された。

2.3 要約

非臨床薬理試験成績から、トフェルセンはヒト SOD1 を選択的かつ強力に抑制することが示唆された。トフェルセンは細胞培養及び種々の *in vivo* モデルの両方で作用を示す。また、*in silico* 及び *in vitro* 評価から、トフェルセンは他の mRNA と比較して、SOD1 mRNA に高い選択性を示すことが確認された。トフェルセンはヒト SOD1 を発現しているラット及びマウスのいずれにおいても、ヒトで到達可能と考えられる濃度で SOD1 mRNA 量を減少させた。さらに、トフェルセンはサルに対して一塩基対のミスマッチがあるにもかかわらず、オンターゲット活性を示した。サルへの IT 投与により ALS に関連の深い CNS 組織の SOD1 mRNA が減少した。トフェルセンが心臓の h*ERG* チャネルを阻害する作用を示す可能性は極めて低く、サルにおける心血管系安全性薬理パラメータに有害な影響は認められていない。サル 39 週間反復投与毒性試験における高用量群の雌 1 例に有害な神経症状（一過性の筋痙攣及び間欠性振戦）が認められた。トフェルセンの標的部位は SOD1 mRNA の 3′-UTR に位置している。この配列はヒトにおいて遺伝的多様性がほ

とんどみられないことから、トフェルセンは SOD1-ALS 患者に対して広く使用できると考えられる。なお、CSF 中 SOD1 タンパク質濃度のデータから、CSF 中 SOD1 タンパク質濃度は CNS 組織内 SOD1 減少の有用なサロゲートマーカーになることが示唆された。

以上の非臨床薬理試験成績から、トフェルセンを SOD1-ALS の疾患修飾療法薬として開発することが支持された。

3 薬物動態試験

トフェルセンの非臨床 PK 特性は、サル 13 週間反復腰髄 IT ボーラス投与試験（666853-AS01 試験）、マウス 12 週間反復 SC ボーラス投与試験（666853-AS02 試験）、ラット単回 IT ボーラス投与試験（666853-AS03 試験）、サル 39 週間反復腰髄 IT ボーラス投与試験（P067-[redacted]-01 試験）及びマウス 26 週間反復 SC ボーラス投与試験（P067-[redacted]-03 試験）により評価した。さらに、妊娠マウス（P067-17-02 試験）及び妊娠ウサギ（P067-17-05 試験）の反復 SC ボーラス投与試験でも、トフェルセンの非臨床 PK 特性を評価した。マウス 12 週間反復 SC ボーラス投与後の組織（肝臓及び腎臓）及びサル 13 週間反復 IT 投与後の組織（肝臓及び腎臓）を用い、トフェルセンの代謝物（未変化体及び短鎖オリゴヌクレオチドを含む各種代謝物）を同定し、そのプロファイリングを実施した。マウス、サル及びヒト血漿タンパク結合率は、限外ろ過法（*in vitro*）により評価した（666853-IS03 試験）。当該試験より得られたデータ及び *in vitro* の薬物相互作用試験で得られたデータの概要を本項に記載する。

3.1 分析法

バリデーション済みの定量的ハイブリダイゼーション ELISA 法により、サルの CSF、血漿及び組織中、並びにマウス及びウサギの血漿中のトフェルセン濃度を定量した。信頼性を確認した高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び液体クロマトグラフィー／質量分析（LC/MS）法により、マウス及びラットの組織中のトフェルセン濃度をそれぞれ定量した。代謝物及び短鎖オリゴヌクレオチドは、マウス組織（肝臓及び腎臓）では HPLC 法により、サル組織（肝臓及び腎臓）では LC/MS 及び液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析（LC/MS/MS）法により、同定及び定量した。詳細は 2.6.4 表 1 に記載する。

3.2 吸収

予定臨床投与経路は IT 投与であることから、サルに単回及び反復 IT 投与後の血漿及び CSF 中の非臨床 PK を評価した。トフェルセンを CSF 内に IT 投与すると、血液脳関門を介さずに、十分な薬剤を標的である CNS 組織中に送達できる。IT 投与後、トフェルセンは速やかに CSF 全体に分布し、代謝クリアランスをほとんど受けることなく CNS 組織に取り込まれた後、CSF ターンオーバーを介して最終的には全身循環中へと移行する。トフェルセンの血漿中における非臨床 PK は、単回及び反復 SC 投与後のマウス並びに反復 SC 投与後の妊娠マウス及び妊娠ウサギでも評価した。トフェルセンの血漿中濃度は、IT ボーラス投与後の全身循環中への移行又は SC ボーラス投与後の全身循環中への吸収後に、多相性に低下し、急速な分布相に続くより緩徐で持続的な消失相を伴っていた。最高濃度到達後のカニクイザルとマウスの血漿中 PK は、おおむね類似しており、トフェルセンの血漿中濃度は、全身組織への広範な分布により、投与 48 時間後までに急速に低下した。詳細は 3.3 項に記載する。

3.3 CSF 及び血漿中薬物動態並びに組織分布

3.3.1 単回投与後の PK 及び組織分布

［4.2.3.2-1］666853-AS02、［4.2.3.1-1］666853-AS03

マウス 12 週間反復投与毒性試験において、単回投与後の血漿中 PK を評価した（666853-AS02 試験）。トキシコキネティクス（TK）群（第 4 及び 5 群）では、CD-1 マウスにそれぞれ 25 及び 150 mg/kg を Day 1 に単回 SC 投与した。いずれの群においても、SC 投与後、トフェルセンは速やかに全身循環中に吸収され、最高濃度到達時間（T_{max}）は両群とも 0.50 時間であった。血漿中濃度は、最高濃度（C_{max}）に達した後、投与後 24～48 時間にかけて急速に低下し、多相性の濃度推移を示した。このことからトフェルセンは、組織へ迅速かつ広範に分布することが示唆された。トフェルセンの単回 SC 投与後の血漿中 C_{max}、及び投与後 0 時間から 48 時間までの濃度時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}48h}$）は、用量に比例して増加した（表 1）。初回投与後、組織中濃度を数時点で測定した。腎臓及び肝臓中の C_{max} は用量依存的に上昇したが、その上昇は用量比を下回った（表 2）（2.6.4.3.1 項及び 2.6.4.4.1.1 項）。

表 1 CD-1 マウスにおける単回 SC 投与後の血漿中トフェルセンの PK パラメータ（雌雄合算）（666853-AS02 試験）

群	用量（mg/kg）	T_{max}（h）	C_{max}（μg/mL）	$AUC_{0\text{-}48h}$（μg*h/mL）
4	25	0.50	14.9	28.8
5	150	0.50	83.6	201

6～7 例／時点のスパースサンプリングからパラメータを算出。
Data source: M4.2.3.2-1_In-text Table 4

表 2 CD-1 マウスにおける単回 SC 投与後の組織中トフェルセンの PK パラメータ（雌雄合算）（666853-AS02 試験）

群	用量（mg/kg）	組織	T_{max}（h）	C_{max}（μg/g）
4	25	腎臓	10	192
		肝臓	10	48.5
5	150	腎臓	10	252
		肝臓	24	105

5～7 例／時点の平均濃度からパラメータを算出。
脳組織中濃度はいずれも定量下限未満（BLQ）であり（定量下限［LLOQ］は 10～25 μg/g）、PK パラメータは算出できず。
Data source: M4.2.3.2-1_In-text Table 6

ラットにトフェルセン 0.1、0.3、1、及び 3 mg を単回 IT ボーラス投与後、特定の CNS 組織（脳皮質及び腰髄）中のトフェルセン濃度を評価した（666853-AS03 試験）。ラット CNS 組織中におけるトフェルセンの平均曝露量は、すべての群で用量依存的であった。トフェルセンを投与したすべての群において、平均腰髄中濃度は平均脳皮質中濃度よりも高かった（2.6.4.4.1.2 項）。

3.3.2 反復投与後の PK 及び組織分布

反復投与後の血漿及び CSF における PK、又は組織分布の結果は、サルを用いた 2 種類の反復

IT 投与毒性試験（投与期間：13 週間又は 39 週間）、マウスを用いた反復 SC 投与毒性試験（投与期間：26 週間）、並びに妊娠マウス及び妊娠ウサギを用いた反復 SC 投与毒性試験により得られた。

3.3.2.1 マウスでの反復投与後の PK

［4.2.3.2-2］P067-[redacted]-03、［4.2.3.2-1］666853-AS02

マウス 26 週間反復投与試験（P067-[redacted]-03 試験）においては、雌雄のマウスに対照（PBS、pH 7.4）（第 1 群）又はトフェルセン（第 2～4 群）のいずれかを投与した。第 1～4 群の動物に、それぞれ 0、6、30、及び 150 mg/kg を、Day 1、15、29、43、57、71、85、99、113、127、141、155、169、及び 183 に SC 投与した。

トフェルセンの血漿中濃度及び PK パラメータを検討したところ、全身曝露は雌雄間で類似していた。本試験のすべての用量で、T_{max} は投与後 1 時間であった。トフェルセンの全身曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は、Day 1 及び 183 において、用量の増加に伴い増加した。トフェルセン 6、30、及び 150 mg/kg を 2 週間に 1 回、26 週間 SC 投与した結果、反復投与によりトフェルセンの曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）のわずかな増加が認められた（表 3）（2.6.4.3.2 項）。

表 3 マウスにおける Day 1 及び 183 の反復 SC 投与後の血漿中トフェルセンの PK パラメータ（雌雄合算）（P067-[redacted]-03 試験）

投与日	群	用量 (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (μg*h/mL)
1	2	6	1	2.65	4.75
	3	30	1	15.5	34.9
	4	150	1	90.7	198
183	2	6	1	5.19	9.67
	3	30	1	20.3	53.8
	4	150	1	125	380

Data source: M4.2.3.2-2_Appendix 16_Table 6.1 & Table 6.2

また、マウス 12 週間反復投与試験（666853-AS02 試験）において、反復投与後の組織中濃度を測定した。脳（前頭葉）中のトフェルセン濃度は、測定したすべての試料で BLQ（LLOQ は 10～25 μg/g）であった。投与後 48 時間である Day 3（初回投与後）及び Day 86（7 回投与後）に測定した腎臓及び肝臓中濃度は用量に依存して増加し、その増加は用量比を下回った（2.6.4.4.1.1 項）。

3.3.2.2 サルでの反復投与後の PK

［4.2.3.2-4］666853-AS01、［4.2.3.2-5］P067-[redacted]-01

カニクイザルにトフェルセンを IT ボーラス投与後の CSF、血漿及び組織中の PK を評価した。13 週間投与試験（666853-AS01 試験）では、第 1～4 群の動物にそれぞれ 0、4、12、及び 35 mg のトフェルセンを Day 1、14、28、56、及び 84 に腰髄 IT ボーラス投与した。さらに、第 5 群（TK 用）の動物には、トフェルセン 12 mg を Day 1、14、及び 28 に腰髄 IT ボーラス投与した。39 週

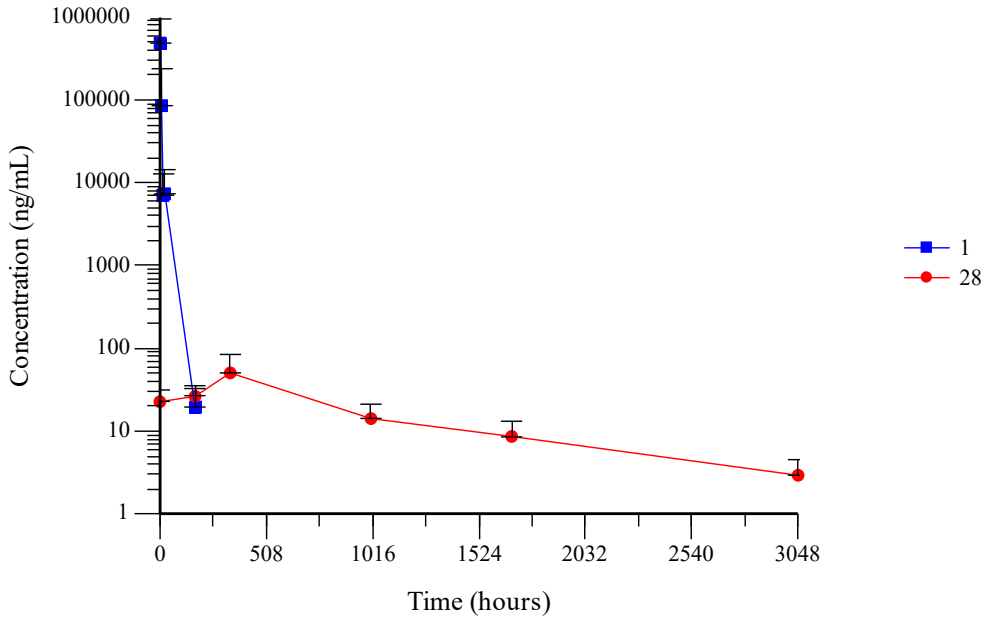
間投与試験（P067-[redacted]-01 試験）では、第 1～4 群の動物にそれぞれ 0、4、12、及び 35 mg のトフェルセンを Day 1、15、29、57、85、113、141、169、197、225、及び 253 に腰髄 IT ボーラス投与した。

トフェルセンを反復 IT 投与したすべてのサルで、用量依存的な CSF 中曝露が認められた。トフェルセンの CSF 中濃度は雌雄のサルで同程度であった。

13 週間投与試験では、第 5 群のサルの Day 1 における CSF 中濃度の結果から、トフェルセンは急速な分布相（投与後 4～16 時間）を示し、その後、より緩徐な消失相を示した（図 4）。第 4 群（Day 84）及び第 5 群（Day 28）の投与後の平均 CSF 中濃度を用いて $t_{1/2}$ を算出すると、それぞれ 19.8 及び 37.2 日であった。各投与前の平均 CSF 中トフェルセン濃度は、Day 14 及び 28 の間では CNS 組織中での蓄積によると考えられる増加が認められ、Day 56 及び 84 における濃度は、Day 28 と同程度の濃度（又は第 4 群では増加傾向）であり、定常状態に達していることが示唆された（図 5）（2.6.4.3.5 項）。

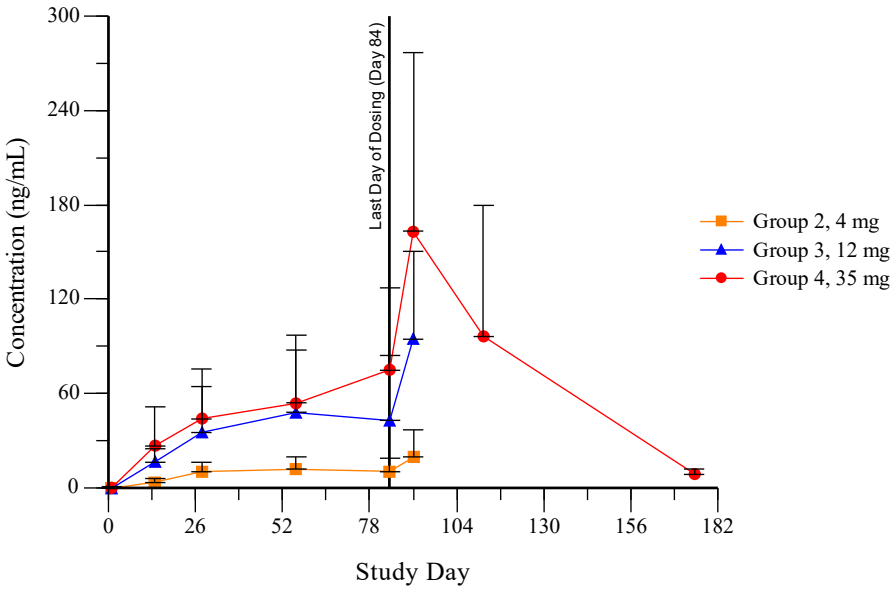
39 週間投与試験では、Day 253（第 4 群）の最終投与後、CSF 中濃度は回復期間中に徐々に減少し、$t_{1/2}$ は 45 日であった。13 週間投与試験と同様に、すべての群で各投与前の CSF 中トフェルセン濃度の平均値は、Day 15 から 29 の間で著しく増加し、その後、すべての用量で試験期間中わずかに増加し続けた（図 6）（2.6.4.3.6 項）。

図 4　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与後の CSF 中トフェルセン濃度の推移（第 5 群、雌雄合算）（666853-AS01 試験）



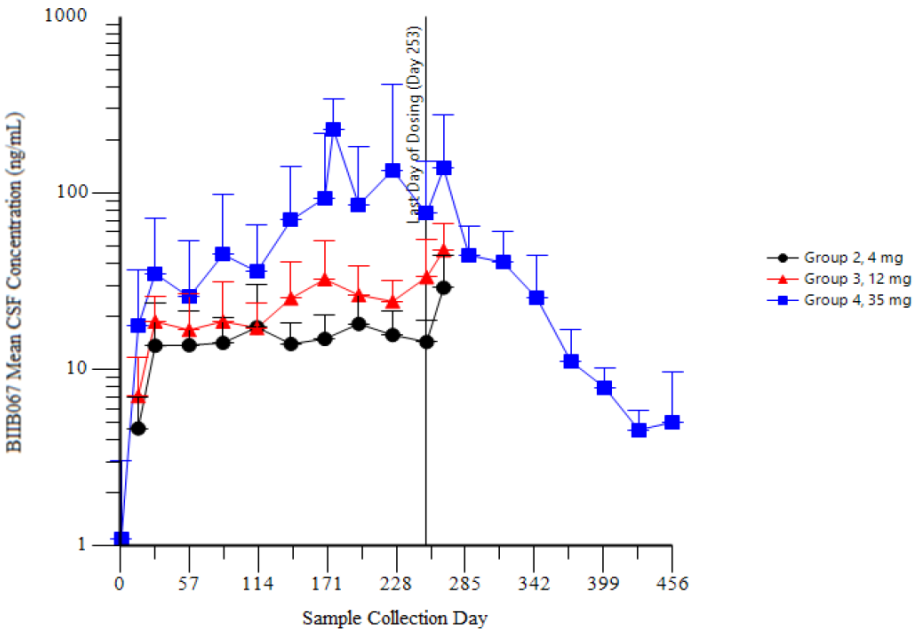
凡例：投与日
図中の各点は、3～16 例の平均値 ＋ 標準偏差（SD）を示す。
Data source: M4.2.3.2-4_Toxicokinetic Phase Report_Figure 2

図 5　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与後の CSF 中トフェルセン濃度推移
（第 2～4 群、雌雄合算）（666853-AS01 試験）



凡例：群、用量
図中の各点は、4～14 例の平均値 ＋SD を示す。
各投与前の CSF 試料は、Day 1、14、28、56、及び 84 に採取された。
Data source: M4.2.3.2-4_Toxicokinetic Phase Report_Figure 1

図 6　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与後の CSF 中トフェルセン濃度の推移
（第 2～4 群、雌雄合算）（P067-[redacted]-01 試験）



凡例：群、用量
図中の各点は、3～20 例の平均値 ＋SD を示す。
Data source: M4.2.3.2-5_Toxicokinetic Phase Report - Plasma, CSF and Special Tissue_Figure 1

サルに単回及び反復 IT ボーラス投与したときの血漿中濃度を測定した。血漿中濃度は雌雄のサ

ルで同程度であった。血漿中トフェルセン濃度は IT ボーラス投与後 1～4 時間にピークに達し、投与後 48 時間以内に急速に低下し、その後、より緩徐な消失相を示した。血漿中濃度の急速な減少は、主に全身組織への広範な分布によるものである。血漿中の終末相 $t_{1/2}$ は 22～51 日と推定され、CSF 及び CNS 組織と同程度であった。13 週間反復投与毒性試験では、IT 投与後の血漿中曝露濃度は用量比を上回って増加した。第 2 群（4 mg/1 回）に対する第 4 群（35 mg/1 回）の用量比が 8.8 倍であるのに対し、Day 1 及び 84 における C_{max} はそれぞれ約 13 倍及び 26 倍増加し、$AUC_{0\text{-}48h}$ はそれぞれ約 25 倍及び 29 倍増加した。39 週間投与試験では、第 2 群（4 mg/1 回）に対する第 4 群（35 mg/1 回）の用量比が 8.8 倍であるのに対し、Day 1 及び 253 における C_{max} はそれぞれ約 23 及び 37 倍増加し、$AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ約 25 及び 23 倍増加した。13 週間及び 39 週間投与試験における IT 投与後の血漿中トフェルセンの PK パラメータを表 4 に示す（2.6.4.3.5.2 項）。

表 4　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与後の血漿中トフェルセンの PK パラメータ（雌雄合算）

用量 (mg)	投与日	N	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}24/48h}$ [a] (ng*h/mL)
4（第 2 群）[b]	1	6	2760 ± 1450	1.5 (1 - 2)	8500 ± 3020
	84	6	1010 ± 492	2 (1 - 4)	6140 ± 2110
12（第 3 群）[b]	1	6	10800 ± 6070	2 (1 - 4)	46200 ± 13800
	84	6	6860 ± 3270	4 (2 - 4)	36000 ± 8630
35（第 4 群）[b]	1	14	35100 ± 11200	2 (1 - 4)	209000 ± 36300
	84	14	26400 ± 15700	4 (1 - 8)	175000 ± 42100
12（第 5 群）[b]	1	16	9660 ± 4360	2 (1 - 4)	48900 ± 14900
	28	14	8480 ± 6570	4 (1 - 4)	40100 ± 9310
4（第 2 群）[c]	1	8	1250 ± 327	2 (1 - 4)	6260 ± 1160
	253	8	995 ± 276	2 (1 - 4)	7730 ± 3390
12（第 3 群）[c]	1	8	11600 ± 4240	2 (2 - 4)	45100 ± 13900
	253	7	4840 ± 2370	4 (2 - 10)	30000 ± 11100
35（第 4 群）[c]	1	20	29100 ± 10600	2 (2 - 4)	159000 ± 30300
	253	8	36800 ± 19900	3 (1 - 4)	179000 ± 67700

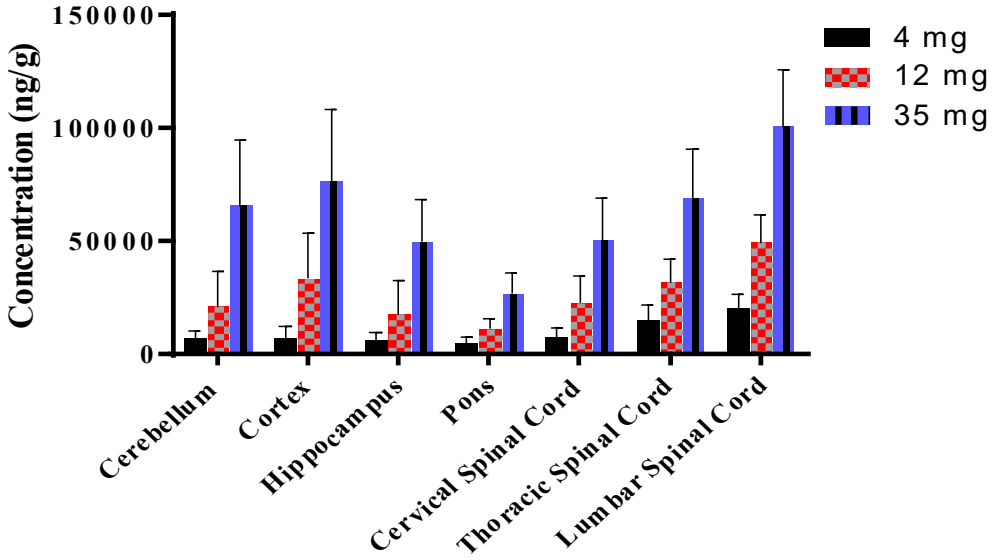
[a] 39 週間投与試験：$AUC_{0\text{-}24h}$、13 週間投与試験：$AUC_{0\text{-}48h}$
[b] 13 週間投与試験（666853-AS01 試験）
[c] 39 週間投与試験（P067-[redacted]-01 試験）
値は平均値 ± SD。ただし、T_{max} は中央値（最小値 – 最大値）。
Data source: M4.2.3.2-4_Toxicokinetic Phase Report_Table 3, M4.2.3.2-5_Toxicokinetic Phase Report - Plasma, CSF and Special Tissue_Table 3

サルに反復 IT 投与後、脊髄、脳組織、肝臓及び腎臓中のトフェルセン濃度を測定した。組織中濃度の解析から、組織分布に性差を示す明確な又は一貫した証拠は認められなかった。サルの 13 週間投与試験（図 7）及び 39 週間投与試験（図 8）では、全般的に、CNS 組織（脳及び脊髄）中濃度の平均値はそれぞれ Day 84 及び 253 の最終投与後において、ほとんどの CNS 組織で用量比を下回る増加を示した。最終投与後、評価したすべての用量において、トフェルセンの CNS 組織中平均濃度は、全般的に腰髄（IT 投与でのボーラス注射部位に一致）が最も高い値を示し、それと同程度又は若干低い濃度が胸髄、頸髄及び脳組織で認められた。腎臓及び肝臓は、オリゴ

ヌクレオチド化合物が全身投与後に分布する主要臓器である［Geary 2003、Yu 2007］。全般的に、13 週間投与試験（図 9）の最終（Day 84）投与後及び 39 週間投与試験（図 10）の最終（Day 253）投与後において、腎皮質及び肝臓中の濃度は用量依存的に増加した。腎臓で認められた濃度の増加は、全般的に用量比を下回り、肝臓では用量比を上回った。CNS 組織と比較して、肝臓及び腎皮質中で比較的高い未変化体濃度が認められたことから、IT 投与されたトフェルセンの高い割合が CSF から全身循環中に分布したことが示された。これは、通常の ASO の IT 投与後のクリアランスメカニズムと一致していた。IT 投与後、ASO の未変化体は血液脳関門を通過できないが、ASO の CNS からのクリアランスは主に CSF から血液及びリンパ液への漏出によって促進され、さらに、そこから肝臓や腎臓などの末梢組織へ移行することによって促進される［Geary 2015、Monine 2021］。

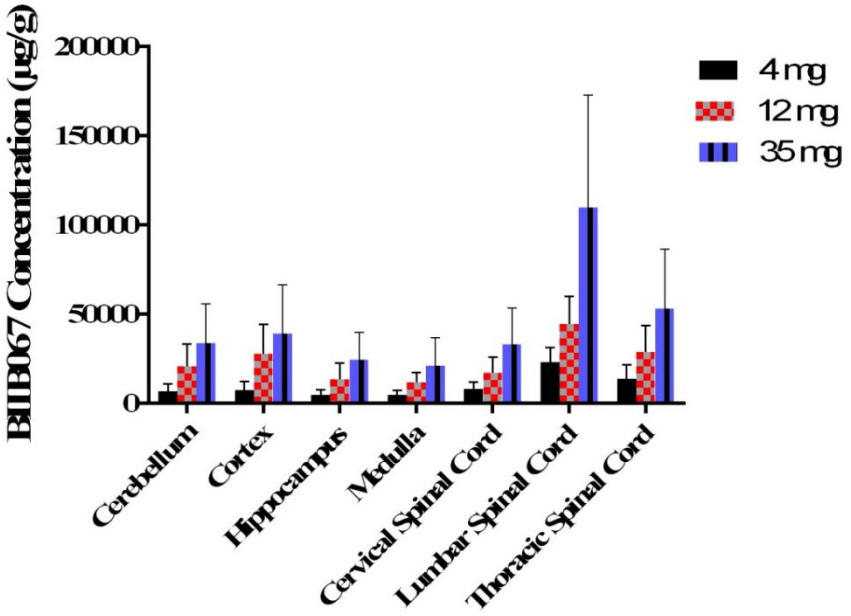
13 週間投与試験の回復期間中、トフェルセンの CNS 組織中からの消失は非常に緩徐であった（図 11）。第 4 群（Day 84）及び第 5 群（Day 28）の動物から算出した CNS 組織中の終末相 $t_{1/2}$ は、30.8～39.9 日であった。腎臓及び肝臓組織中の推定終末相 $t_{1/2}$ は第 5 群の動物で、それぞれ 22.5 及び 19.8 日、第 4 群の動物でそれぞれ 18.4 及び 15.3 日であった。これらの値は、CSF 及び血漿で確認された値と同程度であった。13 週間投与試験の血漿及び組織の PK データを使用して生理学的薬物速度論（PBPK）モデルを構築し、ヒトでの PK 予測に必要な情報を得た［Monine 2021］。

図 7　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与（Day 84）後 168 時間の脳及び脊髄中トフェルセン濃度（雌雄合算）（666853-AS01 試験）



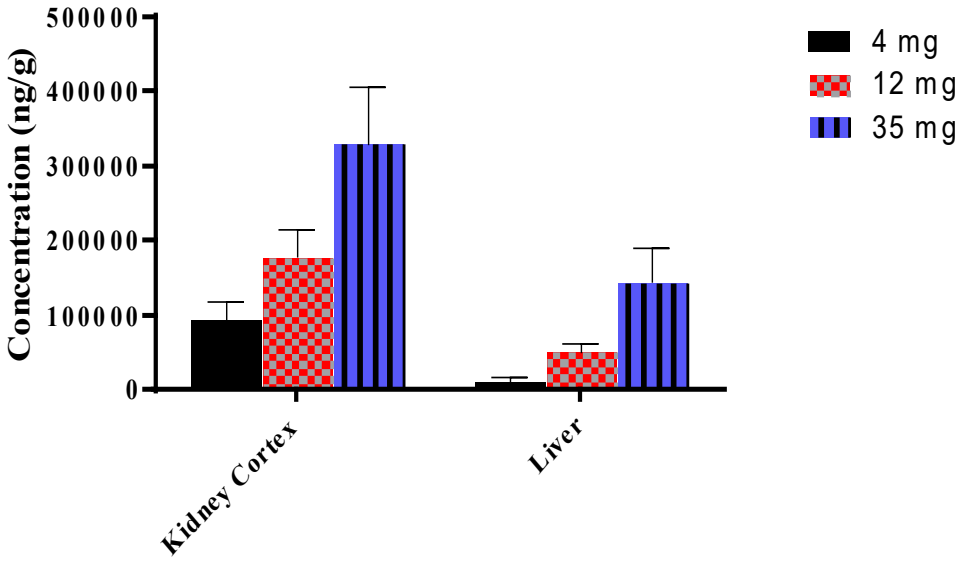
凡例：用量
値は平均値 ＋SD（n = 6）
Data source: M4.2.3.2-4_Toxicokinetic Phase Report_Figure 9

図 8　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与（Day 253）後 Day 267 の脳及び脊髄中トフェルセン濃度（雌雄合算）（P067-[redacted]-01 試験）



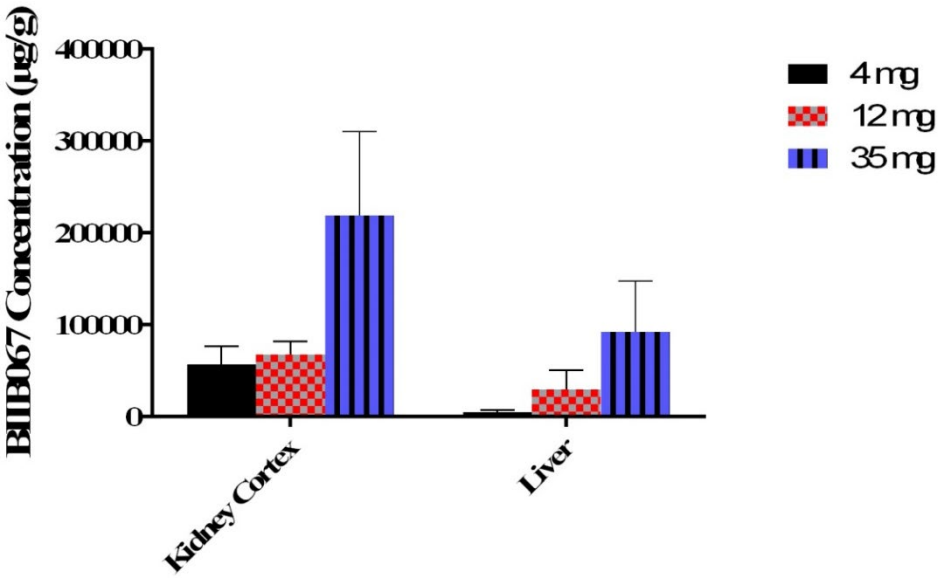
凡例：用量
値は平均値 ＋SD（n＝7～8）
Data source: M4.2.3.2-5_Toxicokinetic Phase Report - Plasma, CSF and Special Tissue_Figure 6

図 9　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与（Day 84）後 168 時間の肝臓及び腎皮質中トフェルセン濃度（雌雄合算）（666853-AS01 試験）



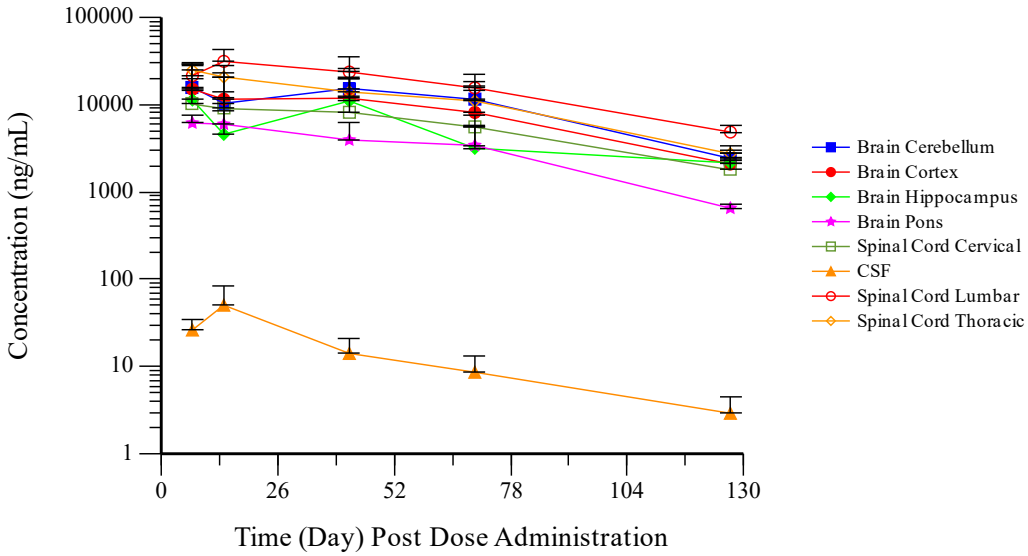
凡例：用量
値は平均値 ＋SD（n＝6）
Data source: M4.2.3.2-4_Toxicokinetic Phase Report_Figure 10

図 10　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与（Day 253）後 Day 267 の肝臓及び腎皮質中トフェルセン濃度（雌雄合算）（P067-[redacted]-01 試験）



凡例：用量
値は平均値 ＋SD（n = 7～8）
Data source: M4.2.3.2-5_Toxicokinetic Phase Report - Plasma, CSF and Special Tissue_Figure 7

図 11　　カニクイザルにおける IT ボーラス投与後の CNS 組織及び CSF 中トフェルセン濃度の推移（第 5 群、雌雄合算）（666853-AS01 試験）



凡例：組織
図中の各点は、2～14 例の平均値 ＋SD を示す。
Data source: M4.2.3.2-4_Toxicokinetic Phase Report_Figure 6

3.3.2.3　　妊娠動物での PK

［4.2.3.5.1-1］P067-17-02、［4.2.3.5.2-3］P067-17-05

P067-17-02 試験では、雌マウスに交配の 15 日前から交配期間中及び妊娠日数（GD）2、4、6、8、10、12、及び 14 に隔日投与した。第 1～4 群の動物に、それぞれ 0、3、10、又は 30 mg/kg を SC 投与した。TK 用試料を GD 6 及び 14 のマウスから採取した。投与方法の詳細及び試験方法は 2.6.4.3.3 項に示す。GD 6 及び 14 における T_{max} は投与後 1 又は 2 時間であった。妊娠マウス（GD 6 及び 14）にトフェルセンを SC 投与したときの血漿中 TK に関しては、全体的に、用量に依存したピーク（C_{max}）及び総曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）が認められた（表 5）。血漿中曝露量はほぼ用量に比例して増加したが、GD 6 における 10 及び 30 mg/kg 間では用量比をわずかに上回って増加した。

表 5　　妊娠マウス（GD 6 及び 14）における 3、10、及び 30 mg/kg 反復 SC 投与後の血漿中トフェルセンの TK パラメータ（P067-17-02 試験）

GD	用量 (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)
6	3	1	963	1810
	10	1	3630	8460
	30	2	16400	52300
14	3	1	1390	3420
	10	2	5860	17200
	30	1	12800	50500

Data source: M4.2.3.5.1-1_Appendix 23_Table 5.1 & Table 5.2

P067-17-05 試験では、妊娠ウサギに GD 7～19 まで隔日で対照（第 1 群）又はトフェルセン（第 2～4 群）を SC 投与した。第 1～4 群の動物に、それぞれ 0、3、10、又は 30 mg/kg の用量で投与した。TK 用試料を GD 7 及び 19 のウサギから採取した。GD 7 及び 19 における T_{max} は投与後 1 又は 2 時間であった。全体的に、GD 7 及び 19 におけるトフェルセンの全身曝露量（平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は用量依存的に増加した（表 6）。観察された C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はほぼ用量に比例して増加したが、GD 7 における 3 及び 10 mg/kg 間の C_{max} のみ用量比を下回って増加した。トフェルセンを隔日に反復 SC 投与しても、GD 7 及び 19 における平均 $AUC_{0\text{-}24h}$ で評価した蓄積は認められなかった。

表 6　　妊娠 NZW ウサギにおける 3、10、及び 30 mg/kg の SC 投与後の GD 7 及び 19 における血漿中トフェルセンの TK パラメータ（P067-17-05 試験）

GD	群	用量 (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)
7	2	3	1 (1 - 2)	14200 ± 5190	41900 ± 1990
	3	10	1 (1 - 2)	19900 ± 2990	131000 ± 15400
	4	30	2 (2 - 2)	60900 ± 7630	454000 ± 121000
19	2	3	2 (2 - 2)	4140 ± 2030	23800 ± 6070
	3	10	2 (1 - 2)	11900 ± 2630	87500 ± 13600
	4	30	2 (2 - 2)	41100 ± 4600	283000 ± 31800

値は平均値 ± SD。ただし、T_{max} は中央値（最小値 – 最大値）。
Data source: M4.2.3.5.2-3_Appendix 17_Table 6.1 & Table 6.2

3.4 代謝

［4.2.3.2-1］666853-AS02、［4.2.3.7.6-1］P067-[redacted]-06、［4.2.2.4-1］DMPK-20[redacted]-0003BT

CD-1 マウスの 12 週間反復 SC ボーラス投与試験（666853-AS02 試験）及びカニクイザルの 13 週間不純物安全性確認試験（P067-[redacted]-06 試験及び DMPK-20[redacted]-0003BT 試験）において、トフェルセンの代謝を評価した。詳細は 2.6.4.5 項に示す。

マウスでは、第 3 群の Day 86 に採取した肝臓及び腎臓試料中において、未変化体と共に、ヌクレアーゼによる代謝と一致するオリゴヌクレオチド推定代謝物が認められた。存在する個々の代謝物の平均値は総ピーク面積の 3%未満であり、ほとんどの代謝物はそれ以下であった。最も多く検出されたオリゴヌクレオチド種はトフェルセン未変化体であり、Day 86 における腎臓及び肝臓組織中に存在する全オリゴヌクレオチドの総ピーク面積に対する未変化体の割合は、それぞれ 89%及び 81%であった。

カニクイザルにトフェルセンを Day 1、15、29、57、及び 85 に 5 回腰髄 IT ボーラス投与後、肝臓及び腎皮質で代謝物が同定された（DMPK-20[redacted]-0003BT 試験）。LC/MS で測定した薬物由来の総ピーク面積の 1%を超える短鎖オリゴヌクレオチドは、Day 92 の雄のプール肝臓で 6 種類、雌のプール肝臓で 12 種類の代謝物が確認され、それらには 5'末端から欠失した N-2、N-15、及び N-16、並びに 3'末端から欠失した N-6、N-7、N-8、N-9、N-10、N-11、N-12、N-13、及び N-14 が含まれた。確認されたこれらすべての短鎖オリゴヌクレオチドは、総薬物由来ピーク面積の 6%未満の代謝物であった。オリゴヌクレオチドの中で最も多く検出された分子種はトフェルセン未変化体であり、総薬物由来ピーク面積に対する割合は、雄のプール肝臓で 80%、雌のプール肝臓で 75%であった。LC/MS において総薬物由来ピーク面積の 1%を超える短鎖オリゴヌクレオチド代謝物が、雄のプール腎皮質で 3 種類、雌のプール腎皮質で 2 種類が、それぞれ確認され、5'末端から欠失した N-2 及び 3'末端から欠失した N-6 及び N-7 の代謝物が含まれた。確認されたこれらの短鎖オリゴヌクレオチドは、すべて総薬物由来ピーク面積の 2%未満の代謝物であった。オリゴヌクレオチド代謝物の中で最も多く検出された分子種はトフェルセン未変化体であり、総薬物由来ピーク面積に対する割合は、雌雄ごとのプール腎皮質でいずれも 92%であった。

3.5 排泄

非臨床試験においてトフェルセンの尿中排泄は評価していない。類似の ASO では、組織中で比較的緩徐な代謝を受けた後、代謝物及び残存未変化体の尿中への排泄が起こる。これは 5-10-5 メトキシエチル（MOE）ギャップマー構造を有する化合物の全身クリアランスの主要排泄経路であり［Geary 2003、Yu 2004、Yu 2007］、トフェルセンの排泄も同様と考えられる。

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

［4.2.2.3-1］666853-IS03、［4.2.3.2-1］666853-AS02、［4.2.2.4-1］DMPK-20[redacted]-0003BT、
［4.2.2.6-3］DMPK-20[redacted]-0020IV、［4.2.2.6-4］DMPK-20[redacted]-0015-C、
［4.2.2.6-1］DMPK-20[redacted]-0015-B、［4.2.2.6-2］DMPK-20[redacted]-0015-A

臨床有効血漿中濃度又はそれ以上の濃度（0.1 及び 30 μg/mL）のトフェルセンによるマウス、

サル及びヒトの血漿タンパク結合率は高く（平均結合率は、マウス：96.18%～96.40%、サル：98.33%～98.42%、ヒト：97.90%～98.12%）、この高いタンパク結合が糸球体ろ過を制限し、トフェルセンの尿中排泄及び腎クリアランスを低下させる（666853-IS03 試験）。しかし、類似の ASO の血漿タンパク結合は比較的弱く（平衡解離定数は μM オーダー）、ASO のような親水性薬物の結合部位は、低分子量の疎水性薬物の結合部位とは異なる［Watanabe 2006］。したがって、血漿タンパク結合の競合により薬物間相互作用を起こす可能性は非常に低い（2.6.4.7.1 項）。

マウス（666853-AS02 試験）及びサル（DMPK-20[redacted]-0003BT 試験）における腎臓及び肝臓試料中で確認されたトフェルセンの代謝物から、トフェルセンは主にエキソヌクレアーゼ（3'-及び 5'-エキソヌクレアーゼ）による加水分解により緩徐に代謝されることが示唆されている。凍結保存されたヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 試験の結果から、トフェルセンは CYP450 による酸化的代謝に対して誘導作用も（DMPK-20[redacted]-0020IV 試験）、阻害作用も（DMPK-20[redacted]-0015-C 試験）示さず、この代謝経路に関して他の薬剤と競合することはないと考えられる（2.6.4.7.2 項）。

トフェルセンは、*in vitro* において排出トランスポーター（BCRP 及び MDR1）並びに SLC トランスポーター（MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2）の基質とはならない（DMPK-20[redacted]-0015-B 試験）。さらに、トフェルセンは、*in vitro* において排出トランスポーター（BCRP、BSEP 及び MDR1）並びに SLC トランスポーター（MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2）の阻害剤にもならない（DMPK-20[redacted]-0015-A 試験）。したがって、これらのトランスポーターの競合又は阻害により薬物間相互作用を引き起こす可能性は非常に低い（2.6.4.7.3 項）。

3.7 考察及び結論

予定臨床投与経路は IT 投与であることから、IT 投与によりトフェルセンの PK 特性を十分に評価できるサルを用いた。全身投与とは異なり、トフェルセンを CSF 内へ IT 投与すると血液脳関門を介さずに、標的である CNS 組織に十分な薬剤を送達できる。トフェルセンの用量依存的な組織分布は、評価したすべての動物種（サル、マウス及びラット）で確認され、組織分布の性差を示す明確な又は一貫した証拠は認められなかった。サルに IT 投与後、トフェルセンは CNS 組織に広く分布した。最も高濃度が観察された組織は腰髄であり、投与経路と一致した。肝臓及び腎臓で比較的高い濃度が観察されたことから、投与されたトフェルセンの高い割合が CSF から全身循環中に分布したことが示された。サルに IT 投与後、CSF 中のトフェルセン濃度は、多相性に低下し、急速な分布相（CSF からのクリアランスが大部分を占めた）に続くより緩徐で持続的な消失相を伴っていた。急速な分布相は、CSF から CNS 組織への迅速で広範な分布によるものであり、これには全身循環への移行によるさらなるクリアランスも含まれる。CSF 中の終末相推定 $t_{1/2}$ は 20～45 日であり、CNS 組織中の終末相 $t_{1/2}$（31～40 日）と同程度であった。血漿中のトフェルセン濃度は、IT ボーラス投与後 1～4 時間にピークに達し、投与後 48 時間以内に急速に低下し、その後、非常に緩徐な消失相を示した。血漿中濃度の急速な低下は、主に全身組織への広範な分布によるものである。血漿中濃度の終末相推定 $t_{1/2}$ は 22～51 日であり、CSF 及び CNS 組織と同程度であった。

4 毒性試験

トフェルセンの非臨床毒性評価は、GLP を適用した、ラット単回 IT ボーラス投与毒性試験（機能観察総合評価［FOB］を含む）、CD-1 マウスを用いた 12 及び 26 週間反復 SC 投与毒性試験、カニクイザルを用いた 13 及び 39 週間反復投与（腰髄 IT ボーラス投与）毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験、染色体異常試験、及び *in vivo* マウス小核試験）、並びにマウス及びウサギの生殖発生毒性試験で行った。さらに、製造工程及び原薬由来不純物を増量した被験物質を用いたサルの 13 週間反復 IT 投与不純物安全性確認試験を実施した。

4.1 単回投与毒性試験

［4.2.3.1-1］666853-AS03

単回投与毒性試験は、SD ラットに 0（対照）、0.1、0.3、1.0、及び 3.0 mg の用量でトフェルセンを IT 投与して実施した。途中死亡例として、3 mg 群の雄 1 例が投与約 45 分後に死亡し、被験物質投与関連と考えられた。死因は脳及び脊髄（頸髄、胸髄、及び腰髄）の病理組織学的検査で確定されなかった。脳のクモ膜下腔／髄膜に軽微な出血が認められたが、同様の変化は計画剖検まで生存した動物にも認められた。3 mg 群の全例で、投与終了後約 25 分以内に一過性の急性触覚過敏が認められた。投与 3 時間後に実施した FOB では、3 mg 群に覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の観察項目スコアの低下が認められた。その後の試験日に同様の一般状態変化はみられなかったため、一過性の変化と判断した。

トフェルセンと関連した有害な剖検及び病理組織所見は、試験用量及び濃度では認められなかった。3 mg 投与動物では、雌雄各 1 例の脳、雌雄各 1 例の頸髄、雌 1 例の胸髄、及び雄 1 例雌 2 例の腰髄に軽微から軽度の血管周囲性単核細胞浸潤が認められた。3 mg 群の雌 3 例の脳及び雌 1 例の胸髄に空胞化／顆粒状マクロファージが認められた。同様に、Day 15 の CSF 細胞検査で、トフェルセン投与群に単核細胞の増加がみられたが、この変化の用量依存性は確認されなかった。

3 mg 投与動物で、1 例の早期死亡、一過性の一般状態変化（触覚過敏）、並びに覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の観察項目スコアの低下が認められたことから、ラットに単回 IT ボーラス投与したトフェルセンの無毒性量は 1 mg と判断された。

4.2 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験は、CD-1 マウスに SC 投与、及びカニクイザルに IT 投与して実施した。

4.2.1 マウス

［4.2.3.2-1］666853-AS02、［4.2.3.2-2］P067-[redacted]-03

CD-1 マウスに SC 投与した反復投与毒性試験として、12 週間投与試験（回復性試験なし）、並びに 26 週間投与及び 8 週間回復性試験の 2 試験を実施した。これらの試験では局所及び全身の安全性を評価した。

12 週間反復投与毒性試験では、0（対照）、25、及び 150 mg/kg の用量でトフェルセンを 2 週間

に 1 回、12 週間反復 SC 投与した。

トフェルセンは 150 mg/kg までの用量で良好な忍容性が認められた。一般状態、SC 投与部位、体重、摂餌量、眼科学的検査ではトフェルセン投与に関連した影響は認められなかった。

白血球数、好中球数、リンパ球数、好酸球数、トリグリセリド、及び血中尿素窒素の低値がトフェルセン投与群に認められた。これらの変化とトフェルセン投与との関連性は不明であったが、一般状態及び病理組織学的検査で明らかな変化が認められなかったことから、毒性学的意義はないと考えられた。

トフェルセン投与に関連した病理組織学的変化は主に腎臓、肝臓、脾臓、並びに顎下及び腸間膜リンパ節で認められた。投薬動物の腎臓で、皮質尿細管の好塩基性細胞質内顆粒の出現頻度の増加が認められた。肝臓では顆粒状物質をほとんど含まないクッパー細胞肥大がみられ、脾臓、顎下リンパ節、及び腸間膜リンパ節では肥大マクロファージの浸潤が認められた。マクロファージの浸潤は、唾液腺、ハーダー腺、眼窩外涙腺、舌、膵臓、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、卵巣、卵管、子宮頸部、膣、乳腺、皮下疎性結合組織、及び投与部位脂肪に遍在性に認められた。これらの病理組織学的変化はいずれも有害影響ではないと判断された。

トフェルセンに関連した病理組織学的変化はいずれも有害影響ではないと考えられ、いずれの用量でも有害影響が認められなかったことから、無毒性量は高用量の 150 mg/kg と判断された。

26 週間反復投与毒性試験では、CD-1 マウスにトフェルセンを 0（溶媒）、6、30、及び 150 mg/kg の用量で、2 週間に 1 回、26 週間反復 SC 投与し、毒性を評価するとともに、発現した変化の回復性を評価した（2.6.6.3.2 項）。

いずれの用量でも、CD-1 マウスにおけるトフェルセン忍容性は良好であった。いずれの用量でも、一般状態、摂餌量、及び眼科学的所見に影響は認められなかった。血液学的検査では 150 mg/kg で、血液生化学的検査では 6 mg/kg 以上でトフェルセン投与に関連した有害影響ではない軽度の変化がみられ、器官重量変化、剖検所見、及び病理組織学的所見（全般に ASO 投与で予想される所見）が 6 mg/kg 以上で認められた。病理組織学的所見として、マクロファージの空胞化（皮膚、投与部位、甲状腺、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、唾液腺、大腿脛骨関節、脳、下垂体、膵臓、肺、心臓、脾臓、肝臓のクッパー細胞、胆嚢、膀胱、気管、食道、胃、盲腸、結腸及び副腎、雄の精嚢腺、前立腺、精巣上体及び精巣並びに雌の膣、卵巣、子宮頸部、子宮）、リンパ球成分の減少（胸腺）、好塩基性顆粒（腎臓）、移行上皮細胞の空胞化（腎臓及び膀胱）、並びに出血、びらん／潰瘍形成、及び混合細胞性炎症（投与部位）が認められた。

典型的なマクロファージの空胞化は、別段の記載がない限り、器官の間質組織又は間質に認められ、変化が認められたいずれの組織にも炎症性、変性性、又は壊死性の変化は認められなかった。この変化は既知の ASO 化合物クラス関連エフェクトであり、オリゴヌクレオチドのリソソーム内蓄積［Braendli-Baiocco 2017］又はオリゴヌクレオチドの蓄積を伴わない細胞活性化及びサイトカイン産生［Frazier 2015］の結果と考えられ、この変化に関連した機能障害は報告されていないことから有害影響ではないと考えられる［Lenz 2018］。

投与期間終了時に認められたトフェルセンに関連したその他の変化は、30 mg/kg 以上の雌雄の腎尿細管における好塩基性顆粒の出現、30 mg/kg 以上の雄及び 150 mg/kg の雌の腎盂移行上皮細

胞の空胞化、すべての用量の雌雄の膀胱移行上皮細胞の空胞化、150 mg/kg の雌雄の胸腺リンパ球成分減少（胸腺重量低下及び小型化と関連）。150 mg/kg の雌雄の投与部位皮膚のびらん／潰瘍（擦過傷／痂皮に関連）、30 mg/kg の雄及び 150 mg/kg の雌の出血発現頻度の増加、150 mg/kg の雄の混合細胞性炎症であった。

すべてのトフェルセンに関連した変化は、8 週間の休薬後に部分的又は完全に回復した。マクロファージの空胞化は、30 mg/kg 以上で皮膚、投与部位、肝臓のクッパー細胞、精巣及び精巣上体、150 mg/kg で唾液腺、膵臓、脳、心臓、脾臓、前立腺、及び腸間膜リンパ節に認められた。30 mg/kg 以上で膀胱移行上皮細胞の空胞化、150 mg/kg の雄 1 例に胸腺リンパ球成分の中等度減少が認められた。腎臓の好塩基性顆粒、投与部位皮膚のびらん／潰瘍、炎症、及び出血はもはや認められなかった。

トフェルセンに関連した病理組織学的所見は、いずれも有害影響ではないと考えられた。本試験条件下では有害影響が認められなかったことから、本試験における無毒性量は 150 mg/kg と判断され、この用量における Day 183 の雌雄合算のトフェルセンの平均 C_{max} は 125 µg/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$ は 380 µg*h/mL であった。

4.2.2 サル

［4.2.3.2-3］SOD1-RS01、［4.2.3.2-4］666853-AS01、［4.2.3.2-5］P067-[redacted]-01

カニクイザルを用いた腰髄 IT 投与による 3 つの反復投与毒性試験を実施した。これらの試験では、臨床投与経路を用いて局所及び全身の安全性を徹底的に評価した。

カニクイザルに腰髄 IT ボーラス投与後のトフェルセンの忍容性、PK 及び PD 特性を検討するため、GLP 非適用で用量漸増毒性試験を実施した。60 mg のトフェルセンを投与した 2 例が投与約 15 分後に中等度から重度の筋収縮（筋痙攣）を発現した（2.6.6.3.3 項）。これらの筋収縮はジアゼパム投与により消失したが、数日間、運動失調が残存した。さらに、30 mg を投与した一部の動物に一過性の反射消失（足及び膝蓋腱反射消失）が認められたが、有害影響ではないと考えられた。60 mg 群の単回投与が不忍容であったことから、サルの GLP 適用 13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験では、より低用量を設定した。

サルの GLP 適用反復投与毒性試験における毒性評価項目は、生存時観察（一般状態、体重、推定摂餌量、及び身体的検査）、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査、血液凝固系検査、尿検査、CSF 細胞数、及び CSF 補体検査）、心血管系評価、及び神経学的検査とした。神経学的検査では、一般感覚（覚醒、視標追跡）、運動機能、脳反射（瞳孔、眼輪筋、角膜）、及び脊髄反射について評価した。病理解剖では、剖検、器官重量測定、及び病理組織学的検査を実施した。

4.2.2.1 サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験及び 13 週間回復性試験

［4.2.3.2-4］666853-AS01

サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験では、カニクイザルに反復投与後のトフェルセン（4、12、及び 35 mg）の局所及び全身毒性を検討し、さらに、投与期間終了後 13 週間の休薬期間にお

ける所見の回復性及び遅発性発現を評価した。全身毒性プロファイルでは、死亡はなく、体重及び推定摂餌量に変化は認められなかった。神経行動学的検査（異常発声、覚醒、常同行動、攻撃性、姿勢、バランス／運動協調性、自発運動、振戦、痙攣／筋痙縮／単収縮、音刺激反応、新規視覚刺激反応、筋緊張、膝蓋腱反射及び足の把握反射）、CSF 細胞数、尿検査、血液ガス分析、眼科学的検査、心血管系評価（心電図［ECG］、心拍数、及び血圧）、器官重量、及び剖検に影響は認められなかった。

35 mg では、雌 2 例に一過性の活動性低下、雌 3 例にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの高値が認められた。また、12 mg を投与した雌雄各 2 例、35 mg を投与した雄全例、雌 2 例に CSF における総タンパク及びアルブミンの高値が認められた。

有害影響ではない病理組織学的所見がすべての用量で脳、腰髄（投与部位）、及びリンパ節に認められた。細胞質空胞化は、すべての用量で、海馬の一部の神経細胞及びそれより軽度で近傍の大脳皮質の神経細胞に認められた。神経細胞空胞化は、細胞の変性／壊死（Fluoro-jade 染色で確認）、グリオーシス、又はニッスル小体消失を示す形態変化を伴わず、13 週間の休薬期間内に完全に回復した。本試験と同様の海馬神経細胞の空胞化は 2'-MOE 修飾 ASO で発現することが知られており、リソソーム内に ASO が蓄積した組織の病理組織標本作製処理によるアーティファクトである［Lamb 2022］。さらに、IT 投与では、恐らく RNase H 依存性の ASO による局所炎症誘発作用として、腰髄投与部位の髄膜に炎症性単核細胞浸潤が発現した。そのような炎症性細胞浸潤の痕跡は、程度は軽かったが 13 週間の休薬期間後にも認められた。組織球空胞化が脳血管周囲の Virchow-Robin 腔、及びリンパ節洞に認められた。この所見は 13 週間の休薬期間内に完全に回復しなかった。頸髄、胸髄、及び腰髄の神経細胞空胞化が回復性試験動物の 1 例の主に前角神経細胞に認められた。この所見は 13 週間の投与期間終了時にはいずれの動物にも認められなかった。トフェルセンと関連している可能性は否定できないが、当該動物では休薬期間終了時に海馬及び大脳皮質の神経細胞空胞化は認められなかった。また、神経細胞空胞化は自然に起こることがある［Butt 2013］。

神経細胞の変性又は壊死、及び関連した一般状態変化は認められなかったことから、この細胞質空胞化は有害影響ではないと考えられた。脳及びリンパ節における組織球空胞化、並びに投与部における炎症性単核細胞浸潤も有害影響ではないと考えられた。したがって、カニクイザルに 13 週間反復 IT 投与したトフェルセンの無毒性量は 35 mg と判断された。

4.2.2.2 サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験及び 26 週間回復性試験

［4.2.3.2-5］ P067-[redacted]-01

サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験では、カニクイザルにトフェルセン（4、12 及び 35 mg）を長期間投与後に、局所及び全身毒性を評価した。サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験では回復性試験動物の 1 例（35 mg）に脊髄の神経細胞空胞化が認められたが、13 週間の投与期間終了時にはいずれ動物にも認められなかったことから、CNS 内の空胞化の特徴をさらに明らかにするため、本 39 週試験では 26 週中間剖検を加えた。

全身毒性プロファイルでは、死亡はなく、トフェルセン投与に起因した体重、摂餌量、及び糞便性状の変化は認められなかった。神経行動評価、血液学的検査、血液凝固系検査、尿検査、眼

科学的検査、及び心血管系評価（ECG 及び血圧）に影響は認められなかった。中間剖検、投与期間終了時及び回復性試験期間終了時の剖検では、被験物質に関連した器官重量変化及び剖検所見は認められなかった。

35 mg 群の雌 1 例の一般状態に有害影響が認められた。このサルでは、2 回目投与後に、一過性の筋痙攣（複数日の投与直後に発現）、麻酔からの覚醒遅延、及び間欠性振戦（投与期間の最後の数ヵ月から剖検まで）を特徴とする神経症状が認められた。ジアゼパムによる治療が複数回の投与時に必要となった。最終投与後に行った脳波（EEG）検査では、投与後シグナルの変化（高周波帯域の変化を伴う）がみられたが、EEG 記録中の筋痙攣は発作（seizure）ではなく、覚醒に関連していた可能性が考えられた。麻酔との相互作用の可能性があった。トフェルセン投与に関連した可能性が考えられたが、これらの神経症状に関連した臨床検査及び病理所見は認められなかった。

複数の脳組織中トフェルセン濃度は全般に同程度であったことから、筋痙攣は脳局所組織中薬物濃度が高かったことによる変化ではないことが示唆された（図 7 及び図 8）。さらに、この所見は他の ASO でも観察されていることから（社内資料）、SOD1 ノックダウンとは関連しない。

中間剖検及び投与期間終了時剖検で、被験物質投与に関連した病理組織所見が脳、脊髄、脊髄神経根、及びリンパ節に認められた。試験 26 週の中間剖検では、35 mg 群の脳及び脊髄で神経細胞の大滴性及び小滴性空胞化、並びに単核細胞浸潤が認められ、脳及びリンパ節に空胞化マクロファージが認められた。39 週間反復 IT 投与した結果、4 mg 以上を投与した動物の海馬神経細胞細胞質に大滴性空胞化が、12 mg 以上を投与した動物の脳及び脊髄に用量依存的な小滴性空胞化が認められた。なお、大滴性空胞化は、神経細胞細胞質領域の大部分を占める単一の大きな細胞質空胞の出現を特徴とし、小滴性空胞化は、神経細胞細胞質領域を様々な程度で占める複数の小さな空胞の出現を特徴とした。4 mg 以上の動物の脳、12 mg 以上の動物の脊髄及びリンパ節、並びに 35 mg の動物の脊髄神経根に、トフェルセンに関連する空胞化マクロファージが認められた。4 mg 以上及び対照群の脳、脊髄、及び脊髄神経根に単核細胞浸潤が認められた。これらの神経細胞空胞化は、細胞変性を示唆する形態的証拠と関連しなかった。

公表文献レビューにより、高用量の反復曝露後に高濃度のオリゴヌクレオチドが蓄積する一部の細胞に空胞が認められることが判明している［Henry 2008、Henry 2012］。複数の公表論文及びレビューで、腎臓及びマクロファージにおける空胞の性質を明らかにしており、空胞化による生理的影響は認められていない［Butler 1997、Horner 1997、Manza 1997、Monteith 1999、Henry 2008、Henry 2012］。

本試験で認められた海馬神経細胞の空胞化は、2’-MOE ベースの ASO で発現することが知られており、リソソーム内に蓄積した ASO に関連した病理組織標本作製処理によるアーティファクトである［Lamb 2022］。海馬神経細胞の大滴性細胞質空胞化は、高用量 ASO の非経口投与後に腎近位尿細管上皮細胞及びその他の常在組織マクロファージで明らかにされた細胞質空胞化と同様の標本処理により発現した可能性がある。腎臓の空胞は、取り込まれたオリゴヌクレオチドがエンドソーム又はリソソームで処理され、組織固定及び標本処理時にオリゴヌクレオチド物質が腫脹又は抽出されたことを反映していると考えられる［Henry 2012］。したがって、ASO 投与による海馬の空胞化は有害影響ではなく、標本組織中に薬物の存在下で組織を保存したことにより生じ

た結果である。

サルを用いたトフェルセンの 39 週間毒性試験では、神経細胞の空胞化は壊死の形態的証拠（すなわち、明るい好酸性細胞質及び核の縮小を伴う神経細胞の縮小）、グリオーシス（すなわち、神経細胞消失後のアストロサイト反応）、及びニッスル小体消失（すなわち、核周部の特異的形態変化）と関連しなかった。また、神経行動バッテリーに変化はなかったことから、神経細胞空胞化による機能的影響はないことが示された。本試験では神経細胞死はみられず、一般状態の変化も認められなかったことから、この神経細胞の空胞化は有害影響ではないと考えられる。

35 mg 投与動物の CNS 組織の超微細構造解析（透過型電子顕微鏡）では、中間剖検時の海馬神経細胞における単一で大型の細胞質内空胞が、中間剖検及び回復性試験剖検時の海馬及び腰髄神経細胞に小さな空胞が認められた。どちらの空胞もエンドソーム／リソソーム由来を示唆する単層境界膜に覆われ、様々な量の積層状又は網状の膜構造、及び脂質又はリポフスチンを伴う又は伴わないトフェルセンの蓄積を示す可能性がある顆粒状物質を含んでいた。したがって、これらの空胞（大滴性又は小滴性）の由来は類似している可能性が考えられ、トフェルセンに関連したエンドソーム／リソソーム系内変化を示す可能性がある。

35 mg 投与動物の 6 ヵ月回復性試験剖検では、脳神経細胞の大滴性空胞化、脳、脊髄、及びリンパ節の空胞化マクロファージ、並びに脊髄の血管周囲性細胞浸潤はいずれも回復性が認められた。脳及び脊髄神経細胞の小滴性空胞化、並びに単核細胞浸潤には回復性は認められなかった。

以上、35 mg を投与した 1 例の神経症状の有害影響に基づき、無毒性量は 12 mg と判断された。

4.3 遺伝毒性試験

［4.2.3.3.1-1］666853-IS01、［4.2.3.3.1-2］666853-IS02、［4.2.3.3.2-1］P067-19-02

トフェルセンの遺伝毒性は、*in vitro* では細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）、及び CHL 細胞株を用いた染色体異常試験、*in vivo* ではマウスを用いた小核試験により評価した。いずれの遺伝毒性試験においても結果は陰性であった。

4.4 がん原性試験

トフェルセンのがん原性試験は、アンメットメディカルニーズの高い生命を脅かすような疾患に対する治療薬の開発に関する ICH M3(R2)ガイドラインの推奨事項に従い、マウスを用いたがん原性試験を実施中である。

サルを用いた反復 IT 投与毒性試験の結果、免疫又は内分泌機能障害は認められなかった。さらに、マウス（12 及び 26 週間）及びサル（13 及び 39 週間）で前がん又は腫瘍性病変はみられなかったことから、トフェルセンの増殖性作用は認められなかった。

4.5 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性は、マウス及びウサギにトフェルセンを SC 投与して評価した。雌雄の受胎能はマウスを用いて評価し、胚・胎児発生試験は妊娠マウス及び妊娠ウサギを用いて実施し、出生前及び出生後発生試験はマウスを用いて実施した。

これらの試験における曝露量は、TK プロファイル（マウス受胎能及び胚・胎児発生試験、並びにウサギ胚・胎児発生試験）及び投与後単一時点における母動物及び胎児組織曝露確認（マウス出生前及び出生後発生試験）により評価した。

雌雄マウスいずれの受胎能にもトフェルセンは有害影響を示さなかった（P067-17-02 試験；2.6.6.6.2 項）。ただし、トフェルセンを投与した雄マウスの病理組織学的評価では、10 mg/kg 以上の用量で精巣の間質組織に軽微～中等度の空胞化両染性マクロファージ、30 mg/kg で軽微～軽度の精細管変性及び精細管拡張、並びに精子細胞滞留が認められた。精巣上体では、10 mg/kg 以上の用量で間質組織に空胞化両染性マクロファージ、30 mg/kg で上皮細胞アポトーシス、細胞残屑増加及び精子減少が認められた。30 mg/kg 群でみられた病理組織変化は有害影響と考えられたが、10 mg/kg 群の変化は、1) 精巣及び精巣上体の空胞化マクロファージの浸潤は軽微～軽度であったこと、2) 同群ではその他の病理組織変化（すなわちアポトーシス、変性、又は精子減少）が認められなかったことから、有害影響ではないと判断した。30 mg/kg 群では、前立腺の絶対重量及び最終体重に対する相対重量が有意に増加した（対照群のそれぞれ 136%及び 127%）。この増加は、同群でみられた精巣及び精巣上体の病理組織変化によるものと考えられた。

雌では、交尾所要日数、交尾率、受胎率、卵巣及び子宮パラメータ、並びに雌性生殖器官重量（絶対及び相対）にトフェルセンと関連した影響は認められなかった。

以上、雄の一般毒性に対するトフェルセンの無毒性量は、30 mg/kg における前立腺重量の増加に基づき 10 mg/kg、雄の生殖に対するトフェルセンの無毒性量は、30 mg/kg における精巣及び精巣上体の病理組織変化に基づき 10 mg/kg であったが、いずれの用量でも雄受胎能に対する影響は認められなかった。

雌の一般毒性及び生殖発生に対するトフェルセンの無毒性量は、最高用量の 30 mg/kg であった。

ウサギでは、死亡、一般状態における有害影響、母動物体重、体重増加量、及び摂餌量に対するトフェルセンの影響は認められなかった。胚・胎児の生存及び胎児体重に対するトフェルセンの影響は認められず、胎児の外表、内臓、及び骨格の異常及び変異に対する影響も認められなかった。これらの結果に基づき、母動物及び胚・胎児発生に対するトフェルセンの無毒性量は 30 mg/kg であった。

マウス出生前及び出生後発生試験では、F0 母動物にトフェルセンを GD6 から 22 及び出生後日数（PND）1 から離乳日の 21 までの期間、2 日に 1 回 SC 投与した。

F0 母動物にトフェルセン（3、10、及び 30 mg/kg）を投与した結果、いずれの用量でも死亡はなかった。いずれの用量でも F0 母動物に一般状態の変化も認められなかった。母動物の平均体重、体重増加量、摂餌量、及び剖検所見は用量群間で同程度であった。

PND13 の投与後、すべてのトフェルセン投与動物の乳汁中にトフェルセンが検出された。しか

し、胎児の肝臓及び脳における生体内分布測定の結果、トフェルセンは胎盤を通過しないことが示されたため、母動物の曝露から発生中の胎児への毒性学的意義のある曝露は認められなかった。

F0 母動物及び F1 児のいずれにも、トフェルセンに関連した影響は認められなかった。

トフェルセンはげっ歯類に対して活性を示さず、SOD1 に対する適切なげっ歯類サロゲート ASO は確認されなかった。非臨床安全性試験でサロゲートを使用することの課題は、目的とする薬理作用とは関連しない異なる毒性パターンを発現することがあることである［Cavagnaro 2014］。生殖発生毒性試験ではサロゲート ASO を使用しなかったが、文献レビューの結果、受胎能に SOD1 が関与していることが判明した。具体的には、SOD1 欠損マウスを野生型雄と比較した精子競合試行で、遺伝型が異なる雌と単独交配させたき、SOD1 欠損雄は受精に失敗し、ほぼ完全な不妊であった［Garratt 2013］。精子の運動性及び機能に関する様々なパラメータも悪化した［Garratt 2013］。［Ho 1998］は、SOD1 ノックアウトマウスでは、野生型マウス及びヘテロ接合ノックアウトマウスに比べて受胎率が著しく低下することを明らかにした。サル 13 週間及び 39 週間毒性試験では、雌雄生殖器の病理組織評価では、生殖器組織に対する影響は認められなかった。SOD1 ノックアウトモデルでの結果から、潜在的ハザード（受胎能の低下）が特定されており、追加試験は必要ではないことが示されている。さらに、PBPK モデル解析に基づき、臨床で 100 mg のトフェルセンの投与後に SOD1 の完全なノックダウンは予測されない。

4.6 薬物乱用性

投与経路及び作用機序を考慮すると、トフェルセンは薬物乱用の可能性がほぼないと予想されるため、薬物乱用性を評価する試験は実施しなかった。トフェルセンは病院内で腰髄 IT 投与されるため、誤投与に関連した薬物乱用リスクは低い。トフェルセンの SOD1 遺伝子及びタンパク質発現を低下させる mRNA への結合の特異的に基づき、薬物乱用性に関連することが知られている受容体には結合しないと推測される。サルを用いた反復投与毒性試験における神経行動評価結果は正常範囲内であり、乱用の可能性がないことと一致する。したがって、トフェルセンは乱用の可能性が低く、規制物質には該当しないと考える。

4.7 その他の毒性試験

4.7.1 光毒性

トフェルセンは、化学構造にヌクレオチド部分を含むことから予測されるとおり、261 nm にピークを有する UV 吸収性を示す。IT 投与によるドラッグデリバリーでは、皮膚中トフェルセン濃度は低いと予想される。カニクイザルを用いた 13 週間及び 39 週間反復 IT 投与毒性試験では、トフェルセンの光毒性を示唆する変化（紅斑、そう痒、浮腫）は認められなかった。

4.7.2 不純物の安全性確認

オリゴヌクレオチド不純物の安全性確認は、原薬ロット（[redacted] を使用）を用いて実施したサルを用いた 13 週間反復投与毒性試験（666853-AS01 試験；2.6.6.3.4 項、及びサルを用いた 13 週間反復投与不純物安全性確認毒性試験（P067-[redacted]-06 試験；2.6.6.8.2 項）の成績から評価した。

予定最高臨床用量（100 mg）における不純物の安全性を確認するために、カスタムメイドの原材料（*出発物質A）を用いて製造工程由来及び原料由来の不純物を合成した後、ASO プラットフォーム工程を用いて[redacted]及び[redacted]した。合計 [redacted] 種類の不純物を配合し、トフェルセン（約[redacted]%）及び最大 [redacted] 種類の不純物を各 [redacted]%～[redacted]%の濃度で含有する 3 種類の TAM を調製した。不純物の安全性を確認するため、サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験を実施した。

これらの毒性試験では、臨床投与レジメンを模して、負荷投与期間及びその後に維持投与期間を設定した。

13 週間反復投与毒性試験の結果、原薬ロット [redacted] は、臨床試験に用いた用量を上回る用量で忍容性が良好であった。不純物を増量したすべての TAM の忍容性は良好であり、有害影響は認められなかった。3 種類の TAM の無毒性量はいずれも 10 mg であった。

以上、いずれの不純物の毒性も十分な許容範囲内にあり、これにより患者に以後の原薬ロットを使用すること及び規格の許容限度値が裏付けられた。したがって、製剤中のこれらの不純物には安全性上の懸念がない。

4.8 安全域

39 週間反復投与毒性試験の結果、カニクイザルにおける無毒性量は 12 mg と判断された。第 III 相臨床試験の予定最高用量（100 mg）での曝露量及び安全域を血漿及び CSF について算出した（表 7）。

表 7 トフェルセン 100 mg の安全域

パラメータ	試料	使用データ	値
C_{max} (µg/mL)	血漿	サル（無毒性量 = 12 mg）、Day 253	4.84
		ヒト（臨床用量 = 100 mg）、Day 85	0.704
		安全域	6.8
$AUC_{0–24h}$ (µg*h/mL)		サル（無毒性量 = 12 mg）、Day 253	30
		ヒト（臨床用量 = 100 mg）、Day 85	13.57
		安全域	2.20
HED (mg)		サル（無毒性量 = 12 mg）	120
		ヒト（臨床用量 = 100 mg）	100
		安全域	1.2

HED はヒトとサル間の約 10 倍の CSF 容積比で換算した。

血漿中及び CSF 濃度における安全域は、第 III 相臨床試験（233AS101 Part C）で観察されたデータから算出した。ヒト C_{max} 及び AUC_{0-24h} は平均値を示す。得られた血漿中濃度推移から台形公式を用いて AUC_{0-24h} を算出した。サルにおける平均値は 39 週間反復投与毒性試験（P067-[redacted]-01 試験）から得られたものである。

これらの安全域は、ALS 患者におけるトフェルセンの安全な使用を裏付けるものである。

*新薬承認情報提供時に置き換え

5 総括及び結論

ALS 患者への投与を裏付けるためのトフェルセンの非臨床試験は、*in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験、薬物動態試験、及び毒性試験からなる。これらの非臨床試験では、標的である CNS 組織中の曝露量と SOD1 mRNA ノックダウンとの相関関係が示された。非臨床試験結果は、CSF スケーリングに基づき、100 mg の臨床用量に対して 1.2 倍の安全域でヒトにおける市販予定用量をサポートしている。サル 39 週間毒性試験の無毒性量は 12 mg と判断され、これを 120 mg の HED に換算した（サルとヒトの CSF 容積比に基づく）。

In vitro 試験において、トフェルセンは、2 種のヒト細胞株及びカニクイザル初代培養肝細胞において SOD1 mRNA 量を減少させた。

ヒト細胞の SOD 1 mRNA に対するトフェルセンの特異性を *in silico* 及び *in vitro* で評価した。トフェルセンの一次配列に基づくオフターゲット候補遺伝子を同定するため、バイオインフォマティクス解析を実施した。*In silico* で予測されたオフターゲット遺伝子は、CNS に発現していない、トフェルセンによって発現が変化しない、又はヒト細胞におけるトフェルセンの抑制作用がオンターゲットの SOD1 mRNA 量減少作用と比較して弱い（IC_{50} が 100 倍超）のいずれかに該当した。

In vivo 試験では、トフェルセンは SOD1 mRNA を減少させ、ヒト SOD1（SOD1-G93A 変異）を発現させたトランスジェニックマウス、トランスジェニックラット及びカニクイザルにおいて SOD1 タンパク質濃度を減少させた。トフェルセンとサル SOD1 mRNA との塩基配列の比較で 1 組のミスマッチ塩基対がみられたが、トフェルセンはカニクイザルの 13 週間反復投与毒性試験において、ALS に最も関連する脊髄や運動皮質を含む CNS 全体で SOD1 mRNA 量を用量依存的に減少させた。トフェルセンは、SOD1-G93A トランスジェニックマウスモデルにおいて、CMAP を指標とする神経筋機能を保護し、生存期間を延長させた。さらに、トフェルセンは、CNS 神経変性のマーカーである pNFH の血清中濃度を有意かつ用量依存的に低下させた。

CSF（サルのみ）、血漿（サル及びマウス）並びに検討した組織（サル、マウス及びラット）中のトフェルセン濃度のデータを評価し、トフェルセンの PK 特性を明らかにした。予定臨床投与経路は IT 投与であることから、トフェルセンの PK 特性を十分に把握するため、サルを用いて評価した。サルに IT ボーラス投与後 CSF 中のトフェルセン濃度は、多相性に低下し、急速な分布相（CSF からのクリアランスが大部分を占めた）に続くより緩徐で持続的な消失相を伴っていた。マウスに SC 投与したとき、トフェルセンは速やかに全身循環中に吸収され、その後サルと同様に、全身組織への広範な分布により 48 時間にわたって減少した。トフェルセンの IT 投与後の分布は、評価したすべての動物種で用量依存的であり、CNS 組織に広く分布した。

安全性薬理試験は、ラット単回投与毒性試験、並びにサル 13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験の一部としても評価した。ラット単回投与毒性試験では、3 mg（1500 mg HED）投与動物に一過性の急性触覚過敏が認められた。また、3 mg 群では、覚醒、歩行、自発運動、呼吸、及び感覚運動の観察項目スコアの低下が認められた。サルを用いた試験では、ECG、心拍数、血圧、血液ガス分析（13 週間試験のみ）、及び神経行動評価（13 週間試験のみ）に、トフェルセン投与と関連した有害影響は認められなかった。39 週間毒性試験では、高用量（35 mg）群雌 1 例の一般状態に有害影響（筋痙攣及び間欠性振戦）が認められた。トフェルセンの心臓の IKr（h*ERG*）チャ

ネル阻害作用は極めて低く（IC_{50} > 34 μM）、サルでは最高用量（35 mg）でも心血管系評価項目に有害影響は認められなかった。

CD-1 マウスにトフェルセンを SC 投与した 26 週間反復投与毒性試験では、トフェルセンの忍容性は良好であった。有害影響が認められなかったことから、無毒性量は最高用量の 150 mg/kg と判断された。

サル 13 週間毒性試験では、最高用量（35 mg）群の雌 2 例で一過性の活動性低下が認められたが、有害影響ではないと判断された。39 週間毒性試験では、35 mg 群雌 1 例の一般状態に有害影響が認められた。この雌では、2 回目投与後に一過性の筋痙攣（複数日の投与直後に発現）、麻酔からの覚醒遅延、及び間欠性振戦（投与期間の最後の数ヵ月間）を特徴とする神経症状が認められた。ジアゼパム投与による治療が複数回の投与時に必要となった。この動物の最終投与後の EEG 検査では、投与後シグナルの変化（高周波帯域の変化を伴う）がみられたが、EEG 記録中の筋痙攣は発作（seizure）ではなく、覚醒に関連していた可能性があることが確認され、麻酔との相互作用の可能性があった。以上、トフェルセンを 39 週間反復 IT 投与したときの忍容性は 12 mg までの用量で良好であり、カニクイザルにおける無毒性量は 12 mg と判断された。

In vitro では細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）、哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験、及び *in vivo* ではマウスを用いた小核試験では、トフェルセンの遺伝毒性は認められなかった。

受胎能試験では、雄マウスにトフェルセンを 3、10、及び 30 mg/kg の用量で 2 日に 1 回（交配前 28 日間、交配中、計画剖検まで）SC 投与した結果、30 mg/kg（累積 AUC で、100 mg のトフェルセン投与後のヒト曝露量の 50 倍超）で、軽微から軽度の精細管変性及び拡張、精子細胞滞留、上皮細胞アポトーシス、精巣内細胞残屑増加、及び精巣上体の精子減少が認められた。しかしながら、交尾及び受胎能、並びに精子パラメータに、トフェルセンと関連した影響は認められなかった。雌マウスではトフェルセンに関連した死亡及び早産はなく、交尾及び受胎能に影響は認められなかった。マウス出生前及び出生後発生試験では、最高用量（30 mg/kg）群でも F0 母動物、並びに F1 出生児の成長及び発達に有害影響は認められなかった。

以上、*in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験結果から、トフェルセンの薬理、薬物動態、及び安全性プロファイルは十分に明らかにされている。サルとヒトにおける IT 投与の安全域は、CSF 容積比（ヒトはサルの約 10 倍）で換算した HED に基づいている。トフェルセンの非臨床安全性プログラムの結果は臨床プログラムを裏付けており、ALS の治療を目的とした承認申請をサポートする適切な安全性データが得られている。

6 参考文献

ALSoD. Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Database (ALSoD) [database on the Internet]. Institute of Psychiatry, Psychology & Neuroscience. Published 2018 [Accessed 28 April 2018].

Andersen PM, Nilsson P, Keränen ML, Forsgren L, Hägglund J, Karlsborg M et al. Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. Brain. 1997;120(Pt 10):1723-37.

Andersen PM, Nordström U, Tsiakas K, Johannsen J, Volk AE, Bierhals T, et al. Phenotype in an infant with SOD1 homozygous truncating mutation. N Engl J Med. 2019;381(5):486-8.

Bali T, Self W, Liu J, Siddique T, Wang LH, Bird TD, et al. Defining SOD1 ALS natural history to guide therapeutic clinical trial design. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017;88(2):99-105.

Braendli-Baiocco A, Festag M, Dumong Erichsen K, Persson R, Mihatsch MJ, Fisker N, et al. From the cover: The minipig is a suitable non-rodent model in the safety assessment of single stranded oligonucleotides. Toxicol Sci. 2017;157(1):112-28.

Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med. 2017;377(2):162-72.

Bruijn LI, Cleveland DW. Mechanisms of selective motor neuron death in ALS: insights from transgenic mouse models of motor neuron disease. Neuropathol Appl Neurobiol. 1996;22(5):373-87.

Bruijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, et al. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science. 1998;281(5384):1851-4.

Bunton-Stasyshyn RKA, Saccon RA, Fratta P, Fisher EMC. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. Neuroscientist. 2015;21(5):519-29.

Butler M, Stecker K, Bennett CF. Cellular distribution of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in normal rodent tissues. Lab Invest. 1997;77(4):379-88.

Butt MT, Sills R, Bradley A. Nervous System. In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, Gopinath C editors. Toxicologic pathology: Nonclinical safety assessment. 1st ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2013. p. 895-930.

Cavagnaro J, Berman C, Kornbrust D, White T, Campion S, Henry S. Considerations for assessment of reproductive and developmental toxicity of oligonucleotide-based therapeutics. Nucleic Acid Ther. 2014;24(5):313-25.

Chi KN, Eisenhauer E, Fazli L, Jones EC, Goldenberg SL, Powers J, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 2005;97(17):1287-96.

Cudkowicz ME, McKenna-Yasek D, Sapp PE, Chin W, Geller B, Hayden DL, et al. Epidemiology of mutations in superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. 1997;41(2):210-21.

Dirksen ML, Crouch RJ. Selective inhibition of RNase H by dextran. J Biol Chem. 1981;256(22):11569-73.

Fischer LR, Li Y, Asress SA, Jones DP, Glass JD. Absence of SOD1 leads to oxidative stress in peripheral nerve and causes a progressive distal motor axonopathy. Exp Neurol. 2012;233(1):163-71.

Frazier KS. Antisense oligonucleotide therapies: the promise and the challenges from a toxicologic pathologist's perspective. Toxicol Pathol. 2015;43(1):78-89.

Fridovich I. Superoxide dismutases. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1986;58:61-97.

Garratt M, Bathgate R, de Graaf SP, Brooks RC. Copper-zinc superoxide dismutase deficiency impairs sperm motility and in vivo fertility. Reproduction. 2013;146(4):297-304.

Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. Adv Drug Deliv Rev. 2015;87:46-51.

Geary RS, Yu RZ, Watanabe T, Henry SP, Hardee GE, Chappell A, et al. Pharmacokinetics of a tumor necrosis factor-α phosphorothioate 2'-O-(2-methoxyethyl) modified antisense oligonucleotide: comparison across species. Drug Metab Dispos. 2003;31(11):1419-28.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science. 1994;264(5166):1772-5.

Henry SP, Johnson M, Zanardi TA, Fey R, Auyeung D, Lappin PB, et al. Renal uptake and tolerability of a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide (ISIS 113715) in monkey. Toxicology. 2012;301(1-3):13-20.

Henry SP, Kim T-W, Kramer-Strickland K, Zanardi TA, Fey RA, Levin AA. Toxicological properties of 2'-O-methoxyethyl chimeric antisense inhibitors in animals and man. In: Crooke ST, editor. Antisense drug technology: Principles, strategies, and applications. 2nd ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2008. p 327-63.

Ho Y-S, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. J Biol Chem. 1998;273(13):7765-9.

Horner MJ, Monteith DK, Gillett NA, Butler M, Henry SP, Bennett CF, et al. Evaluation of the renal effects of phosphorothioate oligonucleotides in monkeys [abstract]. Fundam Appl Toxicol. 1997;36(1 Pt2):147.

Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, et al. Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(3):1604-9.

International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals

for Human Use. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1).

ICH. M3(R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals: Questions & Answers (R2). Current version dated 5 March 2012. Geneva: ICH; 2012.

Koller E, Gaarde WA, Monia BP. Elucidating cell signaling mechanisms using antisense technology. Trends Pharmacol Sci. 2000;21(4):142-8.

Kotzin JJ, Spencer SP, McCright SJ, Kumar DBU, Collet MA, Mowel WK, et al. The long non-coding RNA *Morrbid* regulates Bim and short-lived myeloid cell lifespan. Nature. 2016;537(7619):239-43.

Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. Lancet. 1996;347(9013):1425-31.

Lamb M, Engelhardt JA, Grubor B, Meier WA, Magee TF, Henry SP, et al. Antisense oligonucleotide-related macrovesicular vacuolation of hippocampal neurons in nonhuman primates. Toxicol Pathol. 2022;50(2):197-210.

Lechtzin N, Cudkowicz ME, de Carvalho M, Genge A, Hardiman O, Matsumoto H, et al. Respiratory measures in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. 2018;19(5-6):321-30.

Lenz B, Braendli-Baiocco A, Engelhardt J, Fant P, Fischer H, Francke S, et al. Characterizing adversity of lysosomal accumulation in nonclinical toxicity studies: Results from the 5th ESTP International Expert Workshop. Toxicol Pathol. 2018;46(2):224-46.

Lima WF, Rose JB, Nichols JG, Wu H, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, et al. The positional influence of the helical geometry of the heteroduplex substrate on human RNase H1 catalysis. Mol Pharmacol. 2007;71(1):73-82.

Manza LL, Butler MM, Bennett CF, Levin AA, de Peyster A, Monteith DK. Renal toxicity of phosphorothioate oligonucleotides in rats [abstract]. Fundam Appl Toxicol. 1997;36(1 Pt 2):147.

Miller RG, Mitchell JD, Moore DH. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). Cochrane Database Syst Rev. 2012(3):CD001447.

Miller T, Pestronk A, David W, Rothstein J, Simpson E, Appel SH, et al. A phase I, randomised, first-in-human study of an antisense oligonucleotide directed against SOD1 delivered intrathecally in SOD1-familial ALS patients. Lancet Neurol. 2013;12(5):435-42.

Monine M, Norris D, Wang Y, Nestorov I. A physiologically-based pharmacokinetic model to describe antisense oligonucleotide distribution after intrathecal administration. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2021;48(5):639-54.

Monteith DK, Horner MJ, Gilett NA, Butler M, Geary R, Burckin T, et al. Evaluation of the renal effects

of an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide in monkeys. Toxicol Pathol. 1999;27(3):307-17.

Oki R, Izumi Y, Fujita K, et al. Efficacy and Safety of Ultrahigh-Dose Methylcobalamin in Early-Stage Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. JAMA Neurol. 2022;79(6):575-583.

Park JH, Elpers C, Reunert J, McCormick ML, Mohr J, Biskup S, et al. SOD1 deficiency: a novel syndrome distinct from amyotrophic lateral sclerosis. Brain. 2019;142(8):2230-7.

Qureshi M, Schoenfeld DA, Paliwal Y, Shui A, Cudkowicz ME. The natural history of ALS is changing: improved survival. Amyotroph Lateral Scler. 2009;10(5-6):324-31.

Ratovitski T, Corson LB, Strain J, Wong P, Cleveland DW, Culotta VC, et al. Variation in the biochemical/biophysical properties of mutant superoxide dismutase 1 enzymes and the rate of disease progression in familial amyotrophic lateral sclerosis kindreds. Hum Mol Genet. 1999;8(8):1451-60.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet. 1996;13(1):43-7.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature. 1993;362(6415):59-62. Erratum in:Nature. 1993;364(6435):362.

Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RKA, Fisher EMC, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? Brain. 2013;136(Pt 8):2342-58.

Seehusen DA, Reeves MM, Fomin DA. Cerebrospinal fluid analysis. Am Fam Physician. 2003;68(6):1103-8.

Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, et al. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. J Clin Invest. 2006;116(8):2290-6.

Watanabe TA, Geary RS, Levin AA. Plasma protein binding of an antisense oligonucleotide targeting human ICAM-1 (ISIS 2302). Oligonucleotides. 2006;16(2):169-80.

Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet J Rare Dis. 2009;4:3.

Writing Group, Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neurol. 2017;16(7):505-12.

Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, et al. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. J Neurol. 2020;267(4):944-53.

Yoshida T, Naito Y, Yasuhara H, Sasaki K, Kawaji H, Kawai J, et al. Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. Genes Cells. 2019;24(12):827-35.

Yu RZ, Geary RS, Monteith DK, Matson J, Truong L, Fitchett J et al. Tissue disposition of

2'-O-(2-methoxy) ethyl modified antisense oligonucleotides in monkeys. J Pharm Sci. 2004;93(1):48-59.

Yu RZ, Kim T-W, Hong A, Watanabe TA, Gaus HJ, Geary RS. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100. Drug Metab Dispos. 2007;35(3):460-8.

7 付録

付録 1

Study Number	Study Type	Test Species	Vehicle/ Formulation	Drug Substance Batch Used	Lot No. (Concentration)
666853-AS03	Single dose	SD Rat	aCSF	[redacted]	[redacted] (3.3 mg/mL) [redacted] (10 mg/mL) [redacted] (33.3 mg/mL) [redacted] (100 mg/mL)
666853-AS02	Repeat dose	CD-1 mouse	0.9% NaCl	[redacted]	[redacted] (2.5 mg/mL) [redacted] (15 mg/mL)
P067-[redacted]-03	Repeat dose	CD-1 mouse	PBS	[redacted]	[redacted] (82 mg/mL)
666853-AS01	Repeat dose	Cynomolgus monkeys	aCSF	[redacted]	[redacted] (4 mg/mL) [redacted] (12 mg/mL) [redacted] (35 mg/mL)
P067-[redacted]-01	Repeat dose	Cynomolgus monkeys	aCSF	[redacted]	[redacted] (4 mg/mL) [redacted] (12 mg/mL) [redacted] (35 mg/mL)
666853-IS01	Genotoxicty	*In vitro*	Distilled water	[redacted]	[redacted] (200 mg/mL)
666853-IS02	Genotoxicty	*In vitro*	Distilled water	[redacted]	[redacted] (200 mg/mL)
P067-19-02	Genotoxicty	CD-1 mouse	PBS	[redacted]	[redacted] (75 mg/mL)
P067-17-02	Reproductive Toxicity	CD-1 mouse	PBS	[redacted]	[redacted] (50 mg/mL)
P067-[redacted]-01	Reproductive Toxicity	CD-1 mouse	PBS	[redacted]	[redacted] (50 mg/mL)
P067-17-05	Reproductive Toxicity	New Zealand white rabbit	PBS	[redacted]	[redacted] (50 mg/mL)
P067-[redacted]-04	Reproductive Toxicity	New Zealand white rabbit	PBS	[redacted]	[redacted] (50 mg/mL)
P067-[redacted]-01	Reproductive Toxicity	CD-1 mouse	PBS	[redacted]	[redacted] (75 mg/mL)
P067-[redacted]-06	Other	Cynomolgus monkeys	aCSF	[redacted]	[redacted] (10 mg/mL) [redacted] (10 mg/mL) [redacted] (10 mg/mL)
P067-19-04	Safety Pharmacology	*In vitro*	PBS	[redacted]	[redacted] (82 mg/mL)