トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 3
1 緒言 4
2 参考文献 6

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
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
RNase	ribonuclease	リボヌクレアーゼ
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
SOD	superoxide dismutase	スーパーオキサイドジスムターゼ

1 緒言

トフェルセン（BIIB067）は、スーパーオキサイドジスムターゼ 1（SOD1）遺伝子の変異を伴う筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療を目的として開発された髄腔内投与する 2'-O-(2-メトキシエチル)アンチセンスオリゴヌクレオチド（2′-MOE ASO）である。

ASO は、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）に結合してタンパク質の発現を調節するようデザインされた短い一本鎖の合成核酸である［Rinaldi 2018］。

トフェルセンは、15 個のホスホロチオエートジエステル結合及び 4 個のホスホジエステル結合を有する 20 塩基（20-mer）のオリゴヌクレオチドである。20 個の糖のうち 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）であり、残りは 2′-MOE-D-リボースである。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′-MOE 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。

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

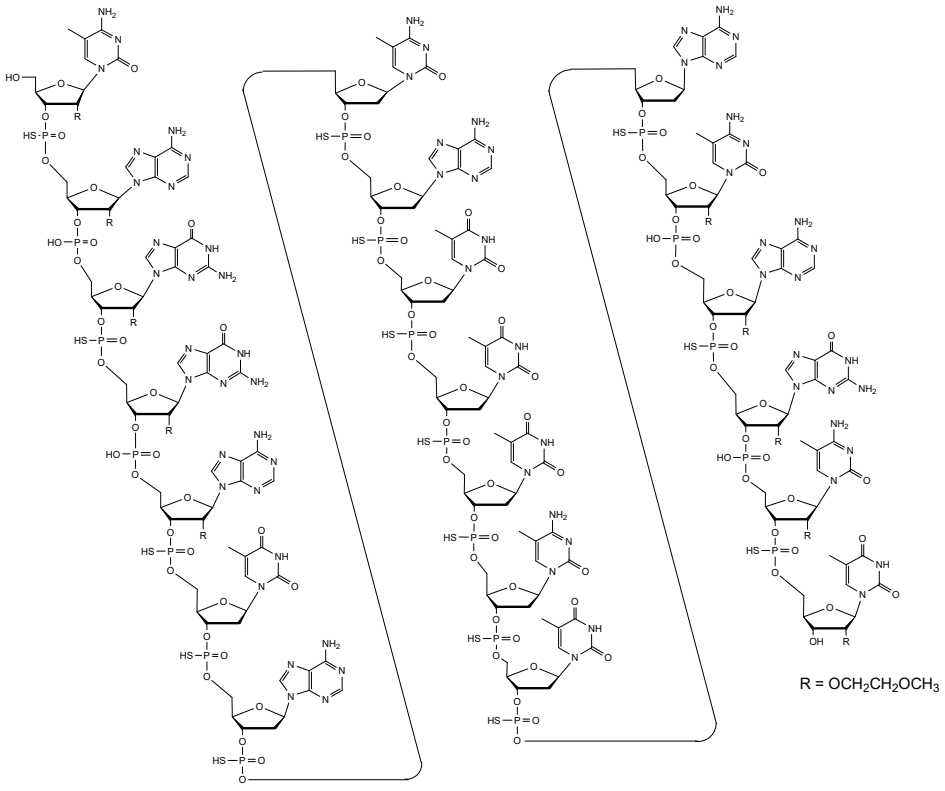
  下線で示す残基は 2′ -MOE ヌクレオシドである。s 及び o はそれぞれホスホロチオエート及びホスホジエステル結合の位置を示す。

- 分子式：$C_{230}H_{317}N_{72}O_{123}P_{19}S_{15}$（遊離酸）

- 分子量：7127.86 amu

トフェルセンの化学構造を図 1 に示す。

図 1 トフェルセンの化学構造



製剤は、ゴム栓及びフリップオフキャップで施栓されたタイプ I ガラスバイアルで供給される。各バイアルには、1.0 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、3.0 mM 塩化カリウム、1.4 mM 塩化カルシウム及び 0.8 mM 塩化マグネシウムを含有する液剤中に 6.7 mg/mL の濃度でトフェルセン 100 mg の単回用量を含有する（pH 7.2）。採取容量 15.0 mL を確保する十分な充填量がある。

トフェルセンは、ヒト SOD1 mRNA の 3′-非翻訳領域（3′-UTR）の一部に相補的であり、ワトソン・クリック塩基対対合（ハイブリダイゼーション）により結合する。同族 mRNA に対するトフェルセンのハイブリダイゼーションの結果、リボヌクレアーゼ H（RNase H）による SOD1 mRNA の分解が起こり、これにより SOD1 タンパク質の合成量及び蓄積量が減少する。

SOD1 遺伝子は、過酸化水素を生成するスーパーオキサイドラジカル（$\bullet O_2^-$）の不均化反応を触媒する、体内に豊富に存在する二量体酵素である銅／亜鉛スーパーオキサイドジスムターゼ（Cu/Zn SOD 又は SOD1）をコードする。以前は、SOD1 の酵素活性の変調により、酸化ストレスに対する保護作用が消失し、それが ALS の原因になると考えられていた。しかし、生化学的機能障害の程度と ALS の臨床症状の間に相関関係がないことが確認されたことから、現在では、SOD1 の病原性突然変異により有害な機能を獲得すると考えられている［Johnston 2000、Kato 2000］。非臨床研究では、マウス又はラットに変異型 SOD1 を過剰発現させると、神経筋接合部の神経支配の消失及び運動ニューロン死といったヒト ALS の重要な特徴が再現される［Bruijn and Cleveland 1996、Gurney 1994］。しかし、SOD1 を喪失させても、最終的に運動ニューロンの機能障害には至るものの、運動ニューロン死は生じない［Fischer 2012、Reaume 1996］。さらに、マウス SOD1 ALS モデルにおける SOD1 活性の喪失又は亢進はいずれも生存期間を変化させない［Bruijn 1998］。SOD1 の変異が神経変性に関与する正確な機序は依然として不明である。SOD1 タンパク質のミスフォールド状態は細胞及び個体間で伝達されることによって病態を誘発すると推測されており［Ayers 2014、Grad 2014］、SOD1-ALS における変異型 SOD1 の病理的役割がさらに裏付けられている。

トフェルセンは、SOD1-ALS に関与するすべての病理的機序（これらはすべて翻訳後の段階で生じる）より上流の事象であるタンパク質翻訳における基質量を減少させるため、すべての SOD1-ALS 患者に治療効果をもたらすことが期待される。

臨床開発で得られたデータから、SOD1-ALS 患者の様々な病期及び表現型（変異の種類、進行速度）にわたってトフェルセン 100 mg 長期投与のベネフィット/リスクのバランスが良好であることが明らかに示されている。

2 参考文献

Ayers JI, Fromholt S, Koch M, DeBosier A, McMahon B, Xu G, et al. Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. Acta Neuropathol. 2014;128(6):791-803.

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.

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.

Grad LI, Yerbury JJ, Turner BJ, Guest WC, Pokrishevsky E, O'Neill MA, et al. Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(9):3620-5.

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.

Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(23):12571-6.

Kato S, Takikawa M, Nakashima K, Hirano A, Cleveland DW, Kusaka H, et al. New consensus research on neuropathological aspects of familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase 1 (SOD1) gene mutations: inclusions containing SOD1 in neurons and astrocytes. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2000;1(3):163-84.

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.

Rinaldi C, Wood MJA. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. Nat Rev Neurol. 2018;14(1):9-21.

トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 3
1 まとめ 5
2 効力を裏付ける試験 9
2.1 トフェルセンの結合部位の解析 9
2.2 培養細胞におけるトフェルセンのヒト SOD1 mRNA 量減少作用 10
2.3 ヒト SOD1 トランスジェニックマウスにおける用量反応性評価 11
2.4 SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間に対するトフェルセン投与時期の影響 13
2.5 SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間及び運動協調性に対するトフェルセンの異なる 2 用量の影響 15
2.6 SOD1-G93A マウスにおけるトフェルセンの作用を検討する電気生理学的及び組織学的試験 17
2.7 SOD1-G93A マウスに対する効果の組織学的検討 20
2.8 SOD1-G93A マウスにおけるトフェルセンの効果の用量反応性解析 22
2.9 ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける用量反応性評価 24
2.10 ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度の減少作用 26
2.11 カニクイザルにおける PK/PD 相関 34
3 副次的薬理試験 37
3.1 ヒト TLR9 を過剰発現させた HEK293XL 細胞における SOD1 ASOs の作用とヒトケモカインの解析 37
3.2 トフェルセンのオフターゲット遺伝子解析 39
3.3 トフェルセンのオフターゲット遺伝子追加解析 43
4 安全性薬理試験 47
4.1 ヒト胎児由来腎細胞に発現させたクローン h*ERG* カリウムチャネルに対するトフェルセンの影響 47
4.2 カニクイザルの中枢神経系、呼吸系、及び心血管系に対するトフェルセンの影響 47
4.3 ラットの中枢神経系及び呼吸系に対するトフェルセンの影響 48
5 薬力学的薬物相互作用試験 49
6 考察及び結論 50
7 図表 52
8 参考文献 53

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
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
C_{max}	maximum observed concentration	最高濃度
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
dbSNP	single nucleotide polymorphisms database	一塩基多型データベース
ECG	electrocardiogram	心電図
EC_{50}	half-maximal effective dose	50%有効濃度
EEG	electroencephalogram	脳波
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
ExAC	Exome Aggregation Consortium	–
FOB	functional obserbational battery	機能観察総合評価法
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）
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICV	intracerebroventricular	脳室内
IL-8	interleukin-8	インターロイキン 8
IP-10	interferon-inducible protein 10	インターフェロン誘導タンパク質 10
IT	intrathecal	髄腔内
NMJ	neuromuscular junction	神経筋接合部
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
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

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
RNase	ribonuclease	リボヌクレアーゼ
rpm	revolutions per minute	回転毎分
SD	standard deviation	標準偏差
SE	standard error	標準誤差
SNP	single nucleotide polymorphism	一塩基多型
SOD1	superoxide dismutase 1	スーパーオキサイドジスムターゼ 1
TLR	Toll-like receptor	Toll 様受容体
WT	wild type	野生型

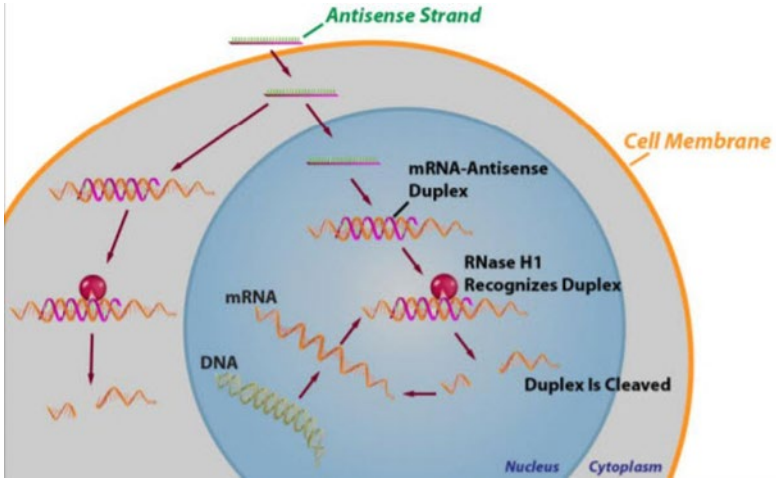
1 まとめ

トフェルセン（開発コード：BIIB067 及び ISIS 666853）は、ヒトスーパーオキサイドジスムターゼ 1（SOD1）遺伝子の 3'-非翻訳領域（3'-UTR）に特異的に結合する 20 塩基からなるアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）である。SOD1 変異は筋萎縮性側索硬化症（ALS）の遺伝的原因の 1 つである。200 以上の SOD1 遺伝子変異（以下、SOD1-ALS）が ALS の原因であると報告されており、SOD1 変異によって疾患の進行速度は様々である。進行速度が様々であるにもかかわらず、ALS の発症機序は SOD1 変異型間で類似していることを示す有力なエビデンスが存在する。すなわち、タンパク質が有害な機能を獲得することにより、運動ニューロン死に至る神経毒性が開始される。この神経毒性を引き起こす最初の原因は様々であるが、いずれにおいても SOD1 タンパク質の凝集性が増加する。トフェルセンは、すべての SOD1 mRNA 転写物を分解することから、すべての SOD1 変異を有する ALS 患者に対して治療効果をもたらすことが予想される。

本項に記載した *in vitro* 試験の結果により、トフェルセンがヒト SOD1 mRNA に結合することを示し、一連の *in vivo* 試験によりトフェルセンの効力及び作用持続時間を評価した。

トフェルセンはコアに 10 の非修飾オリゴヌクレオチドを含み、これに 5 つの修飾オリゴヌクレオチドが隣接している。修飾オリゴヌクレオチドの糖鎖はリボース 2'-修飾（2'-MOE）されており、トフェルセンの安定性と剛性を高めている。非修飾オリゴヌクレオチドはリボヌクレアーゼ H1（RNase H1）により標的を開裂し、効果的に mRNA 量を減少させ、最終的に SOD1 タンパク質を喪失させる（図 1）。

図 1 ASO が結合した標的 mRNA の RNase H1 による分解



RNase H1 による mRNA の分解：ASO は標的 mRNA に結合し、mRNA-ASO ヘテロ二本鎖を形成する。その二本鎖に RNase H1 が動員され、二本鎖が分解される。RNase H1 による分解後の断片は、その後、RNA 分解経路によって処理される。

トフェルセンの薬理試験の一覧を表 1 に示す。

トフェルセンの SOD1 mRNA への結合及び選択性は、3 種のヒト細胞株（神経芽腫細胞株 SH-SY5Y、上皮癌由来細胞株 A431 及び iCell 神経細胞）及びバイオインフォマティクス解析により評価した。これらの試験から以下のことが示された：

- トフェルセンは各種細胞株でヒト SOD1 mRNA 量を濃度依存的に減少させたが、陰性対照 ASO の ISIS 141923 は SOD1 mRNA 量を減少させなかった。
- トフェルセンは、カニクイザルの SOD1 と 1 塩基のミスマッチがみられたが、カニクイザルの初代培養肝細胞の試験ではその活性は維持されていた。このことから、サルはトフェルセンの薬理評価に適した動物種であることが示された。
- ヒト SOD1 の配列と 0 又は 1 つ異なるオフターゲット候補遺伝子は同定されなかった。2 つのミスマッチ、欠失、又は挿入を有する遺伝子が 27 個同定された。これらのオフターゲット候補遺伝子は、中枢神経系（CNS）での発現がみられない、トフェルセンにより発現が変化しない、あるいはトフェルセンにより発現が抑制されたが、その効力はヒト細胞における SOD1 mRNA 量に対する効力と比較して 100 分の 1 未満（50%阻害濃度［IC_{50}］が 100 倍超）であったことから、トフェルセンは SOD1 mRNA に高い選択性を持つことが示された（EXP-OT-[redacted]20[redacted] 試験、EXP-[redacted]-AA0331 試験）。
- トフェルセンの標的配列は SOD1 mRNA の 3'-UTR に位置している。ヒト遺伝子情報データベースで解析したところ、この領域に一塩基多型（SNP）は認められず、トフェルセンの結合部位には ALS に特異的ないかなる多型も認められなかった。したがって、トフェルセンは、ALS での変異を含め、すべてのヒト SOD1 mRNA に広範に作用すると考えられる。

ヒト SOD1（SOD1-G93A 変異）遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウス［Gurney 1994］及びトランスジェニックラットを用いて、トフェルセンの用量反応性、有効性、及び生存期間に対する作用を *in vivo* 試験で検討した。SOD1-G93A マウスモデルは利用可能な唯一の ALS の病態モデルであり、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臨床で観察される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 導入遺伝子にはトフェルセンの標的配列が含まれている。トフェルセンの有効性を、SOD1-G93A マウスを用いて、生化学的、免疫組織化学的、及び機能的に検討し、以下の結果を得た：

- トフェルセンの脳室内（ICV）投与による腰髄中の SOD1 mRNA 量減少作用の 50%有効濃度（EC_{50}）は、約 1 μg/g であった（EXP-[redacted]-AA2184 試験）。
- トフェルセンは疾患発症までの時間を有意に延長し、生存期間を延長させた（ASO-13 試験、ASO-14 試験）。
- トフェルセンは脊髄運動ニューロンの生存を保護することにより筋神経支配を増加させ（ASO-27 試験）、その結果、筋線維の組成、活性、及び機能が用量依存的に改善された（ASO-15 試験、ASO-27 試験、ASO-28 試験）。

トフェルセンの効力及び持続時間を、SOD1-G93A ラットで検討した。SOD1-G93A ラットに髄腔内（IT）投与したときの SOD1 mRNA 量に対するトフェルセンの EC_{50} は、腰髄で 1.4 μg/g、頸髄で 2.3 μg/g であった。さらに、SOD1-G93A ラットにトフェルセンを ICV（1 mg）又は IT（1 又は 3 mg）投与し、SOD1 mRNA 量及びタンパク質濃度を 8 週間まで測定したところ、3 投与のいずれにおいても SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度の持続的な減少が認められた。mRNA 量減少の程度は、総じてタンパク質濃度減少の程度よりも大きかった。脳脊髄液（CSF）中の SOD1

タンパク質濃度を測定したところ、トフェルセン単回投与 8 週後に 50%の減少が認められた。

薬物動態／薬力学（PK/PD）相関を、カニクイザルの 13 週間反復投与毒性試験で検討した。カニクイザルにトフェルセン 4、12、及び 35 mg を腰部に IT ボーラス投与した。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）投与し、最終投与 1 週後に mRNA 量を測定した。追加の PK 測定群では 12 mg を同じスケジュール（1、14、及び 28 日目）で投与した。解析には腰髄、胸髄、頸髄、前頭皮質、小脳、橋、及び海馬を用いた。トフェルセンは、ALS に最も関連の深い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。また、トフェルセンを投与したカニクイザルの CSF を評価したところ、最終剖検時（91 日目）に、3 つのすべての用量群において、対照投与群と比較して、SOD1 タンパク質濃度を用量依存的に減少させた。

安全性薬理パラメータとして、*in vitro* のヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子（h*ERG*）カリウムチャネル阻害試験、*in vivo* でのラット単回投与毒性試験、カニクイザル 13 週間及び 9 ヵ月間反復投与毒性試験を実施した。

非臨床薬理試験成績から、トフェルセンはヒト SOD1 mRNA の 3'-UTR に特異的に結合し、ヒト SOD1 mRNA の分解を促進することが示された。また、トフェルセンの臨床投与経路である IT ボーラス投与の妥当性が示されるとともに、作用持続時間も長かったことから、月 1 回投与が可能であると考えられた。これらのことから、SOD1 変異を有する ALS 患者の治療薬としてのトフェルセンの臨床使用と製造販売承認申請が可能であることが裏付けられた。

表 1　　トフェルセンの薬理試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法	試験番号
効力を裏付ける試験			
トフェルセンの結合部位解析	バイオインフォマティクス解析	該当なし	EXP-[redacted]-AA0330
培養細胞におけるトフェルセンのヒト SOD1 mRNA 減少作用（*in vitro* 試験）	ヒト SH-SY5Y 細胞及び A431 細胞；カニクイザル初代培養肝細胞	*In vitro*	EXP-[redacted]-AA0329
ヒト 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用量反応性評価	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	EXP-[redacted]-AA2184
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間に対するトフェルセンの投与時期の効果	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	ASO-13
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間及び運動協調性に対するトフェルセンの異なる 2 用量の作用	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	ASO-14
ヒト 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作用の電気生理学的及び組織学的試験	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	ASO-15

試験の種類	試験系	投与方法	試験番号
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウスに対する作用の組織学的検討	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	ASO-27
ヒト 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効力の用量反応性解析	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	ASO-28
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける用量反応性評価	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラット	IT	EXP-[redacted]-AA2185
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける SOD1 アンチセンスオリゴヌクレオチドであるトフェルセンの *in vivo* における効力（RNA 量とタンパク質濃度）の経時変化	ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラット	IT、ICV	EXP-[redacted]-AA2186
カニクイザルにおけるトフェルセンの PK/PD 相関	カニクイザル	IT	666853-AS01
副次的薬理試験			
ヒト TLR9 を過剰発現した HEK293XL 細胞への SOD1 ASO の処置とヒトケモカインの解析	ヒト TLR9 を過剰発現させた HEK293XL 細胞	*In vitro*	SOD1-HEKhTLR9-1
トフェルセンのオフターゲット遺伝子解析	*In silico*、ヒト SH-SY5Y 細胞及び A431 細胞	*In vitro*	EXP-[redacted]-AA0331
トフェルセンのオフターゲット遺伝子追加解析	*In silico*、ヒト A431 細胞及び iCell 神経細胞	*In vitro*	EXP-OT-[redacted]20[redacted]
安全性薬理試験			
ヒト胎児由来腎臓細胞に発現させた h*ERG* カリウムチャネルに及ぼすトフェルセンの影響	HEK293XL 細胞	*In vitro*	P067-19-04
カニクイザルを用いたトフェルセンの 13 週間反復 IT 投与毒性及び薬物動態並びに 13 週間回復性試験	カニクイザル	IT	666853-AS01
カニクイザルを用いたトフェルセンの 9 ヵ月間反復 IT 投与毒性及び薬物動態並びに 6 ヵ月間回復性試験	カニクイザル	IT	P067-[redacted]-01
Sprague-Dawley ラットを用いたトフェルセンの単回 IT ボーラス投与毒性試験	Sprague-Dawley ラット	IT	666853-AS03

2 効力を裏付ける試験

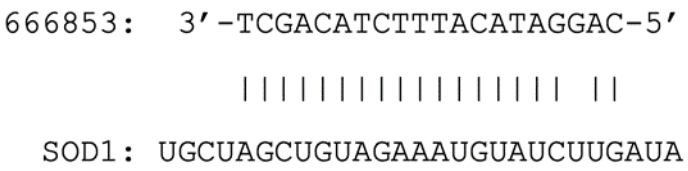
2.1 トフェルセンの結合部位の解析

［4.2.1.1-1］EXP-[redacted]-AA0330、［4.2.1.2-2］EXP-[redacted]-AA0331、
［4.2.1.2-3］EXP-OT-[redacted]20[redacted]、［4.3-14］Cioffi 1997、
［4.3-61］Vickers 2003、［4.3-72］Zhang 2000、
［4.3-43］Lek 2016、［4.3-65］Wroe 2008

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、その標的配列はヒト SOD1 mRNA の 3'-UTR に位置している。2 とおりのオフターゲット候補遺伝子解析を実施した。1 つ目は、トフェルセンによる他のヒト遺伝子への結合能であり（3.2 項及び 3.3 項）、2 つ目は、トフェルセンによるヒト以外の動物種の SOD1 mRNA への結合能であった。ヒト以外の動物種と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。ヒトにおけるオフターゲットの解析については、オフターゲット解析報告書に記載した（3.2 項 ; EXP-[redacted]-AA0331 試験、3.3 項 ; EXP-OT-[redacted]20[redacted] 試験）。マウスとラットについては、候補配列をマウスとラットの完全なトランスクリプトームと比較した。結果、4 つ以下のミスマッチを有する標的は同定されなかった。

トフェルセンはカニクイザルの SOD1 mRNA と 3 番目の塩基で単一塩基対のミスマッチが検出された（図 2）。

図 2 トフェルセンはサル SOD1 mRNA と単一塩基対ミスマッチを持つ



トフェルセン（666853 : 配列 : 5’- CAGGATACATTTCTACAGCT）とカニクイザル SOD1 遺伝子との核酸アラインメントを Emboss needle アラインメントツールを用いて行った。トフェルセンはカニクイザル SOD1 mRNA トランスクリプトとの比較で 3 番目（5’末端から 3 つ目）の塩基で GU ミスマッチが検出された。
Data source: M4.2.1.1-1_Figure 2

2.2 項に示したデータから、一塩基対ミスマッチは、細胞培養系でのトフェルセンの効力に影響を与えなかった（図 4）。しかし、トランスジェニックマウスとサルの間でみられる効力差は、この一塩基対ミスマッチにより部分的に説明できる可能性がある（図 6 と図 31 の比較）［Cioffi 1997、Vickers 2003、Zhang 2000］。

トフェルセンは ALS 患者への臨床使用が予定されていることから、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。一般集団の変動を同定するため種々のデータベースを使用した。一塩基多型データベース（dbSNP version 141: single nucleotide polymorphisms database）では、rs11556622 及び rs41391245 の 2 つの多型が報

告されている。しかし、SNP rs11556622 の配列はバリデートされておらず、集団内頻度の情報が欠如している。SNP rs41391245 は 1000 ゲノム集団中 0.1%未満の頻度で認められているが、ExAC データベースには含まれていなかった。ExAC データベースは調査時において、60000 名を超えるエキソーム配列データが含まれていた［Lek 2016］。要約すると、ヒト SOD1 の 3'-UTR における SNP は非常にまれであることが強く示唆される。

ALS 患者から得られた SOD 1 配列に対する追加の検索を行った。ALSoD データベースには、ALS 患者 331 例の SOD 1 配列の多型が含まれている［Wroe 2008］。その結果、トフェルセンの結合部位に多型は認められなかった。これらのことから、トフェルセンは、ヒト集団において広範に保存されている SOD1 配列を標的とすることが示唆された。

以上のインフォマティクス解析により、対象患者集団はトフェルセンの結合部位を有していることが裏付けられた。さらに、トフェルセンとカニクイザル遺伝子との比較で一つのミスマッチ塩基対がみられるものの、トフェルセンはサルで活性を示すことから、サルを用いたオンターゲット作用が評価できると考えられる。

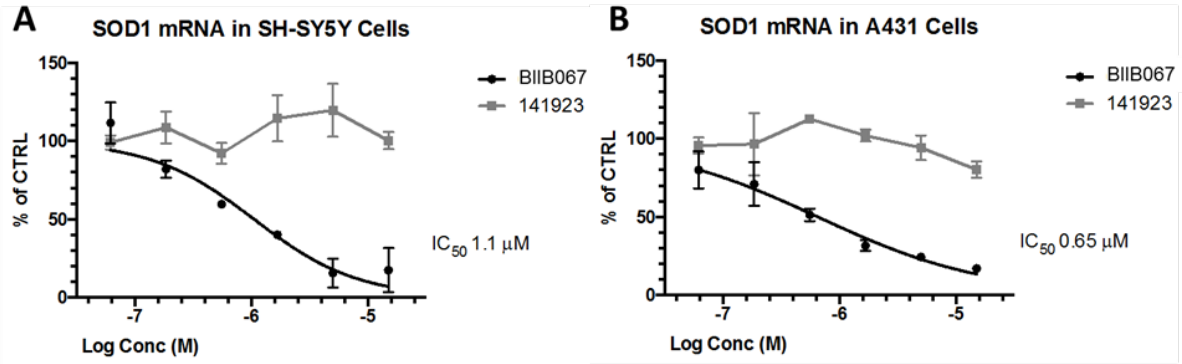
2.2 培養細胞におけるトフェルセンのヒト SOD1 mRNA 量減少作用

［4.2.1.1-2］EXP-[redacted]-AA0329

トフェルセンは、最初に *in vitro* の SOD1 mRNA 量減少作用を指標に、約 2000 のオリゴヌクレオチドの単一濃度スクリーニングより同定された後、SOD1 mRNA に対する作用が定量化された。トフェルセンの *in vitro* での効力は、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）で検討された。トフェルセンによる SOD1 mRNA 量の減少作用を、ヒト遺伝子を標的としない陰性対照オリゴヌクレオチドの ISIS 141923 と比較した。漸増濃度のトフェルセン（0.062～15 µM）を添加し、24 時間後の SOD1 mRNA 量を定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法で定量した。

両細胞株において、トフェルセンは SOD1 mRNA 量を濃度依存的に減少させ、その IC_{50} は SH-SY5Y 細胞で 1.1 µM、A431 細胞で 0.65 µM であった（図 3）。陰性対照オリゴヌクレオチドの ISIS 141923 はいずれの細胞株においても活性を示さなかった。これらのデータから、トフェルセンは培養細胞でヒト SOD1 mRNA 量を強力に減少させることが示された。

図 3 培養細胞におけるトフェルセンのヒト SOD1 mRNA 量減少作用

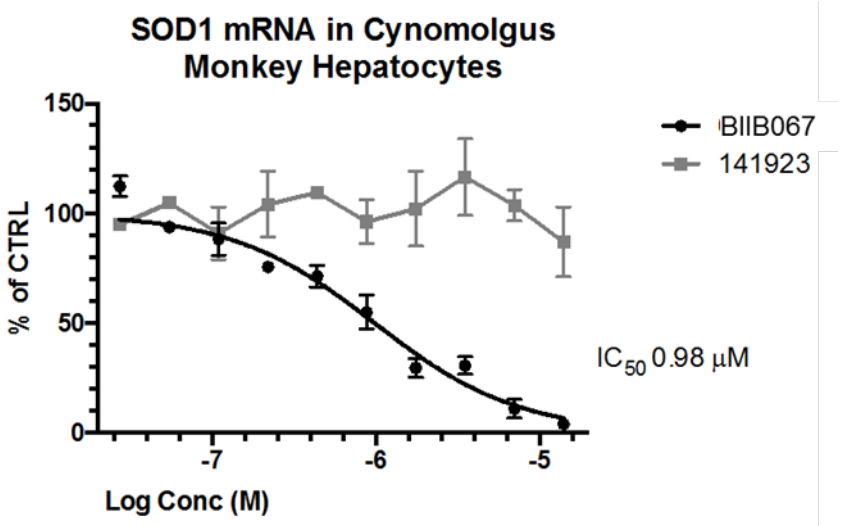


トフェルセン（BIIB067）は、(A) SH-SY5Y 細胞及び(B) A431 細胞の SOD1 mRNA 量を濃度依存的に減少させた。

算出された IC_{50} 値は SH-SY5Y 細胞及び A431 細胞で、それぞれ 1.1 μM 及び 0.65 μM であった（n = 2、% control［溶媒処置の mRNA 量に対する割合］の平均値 ± 標準偏差［SD］）。陰性対照 ASO である ISIS 141923（141923）は、SOD1 mRNA 量に有意な影響を及ぼさなかった。
Data source: M4.2.1.1-2_Figure 1

トフェルセンは、すでに公表されているカニクイザル SOD1 mRNA 配列との比較において、一つのミスマッチ塩基対が含まれている（図 2）。トフェルセンがサルの SOD1 と交差反応性を示す場合は、その後の *in vivo* 安全性試験でオンターゲット毒性を評価できると考えられるため、カニクイザル SOD1 に対するトフェルセンの効力を *in vitro* 及び *in vivo* の両方で評価した。カニクイザルの初代培養肝細胞にトフェルセン（0.0273～14 μM）を添加し、24 時間後の SOD1 mRNA 量を定量した。その結果、ヒト細胞での試験と同様に、トフェルセンはサル肝細胞において SOD1 mRNA を濃度依存的に減少させ、その IC_{50} は 0.98 μM であった（図 4）。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。

図 4　　カニクイザル肝細胞におけるトフェルセンの SOD1 mRNA 量減少作用



カニクイザルの初代培養肝細胞にトフェルセン（BIIB067）を漸増濃度で添加した。24 時間後に SOD1 mRNA を定量した。トフェルセンはサルの SOD 1 mRNA 量を用量依存的に減少させた。IC_{50} は 0.98 μM であった（n = 2、% コントロール［溶媒処置の mRNA 量に対する割合］の平均値 ± SD）。一方、陰性対照の ASO 141923（141923）はサルの SOD1 mRNA 量を変化させなかった。
Data source: M4.2.1.1-2_Figure 2

トフェルセンの効力は、*in vivo* での標的の抑制を検討する前に実施した ASO の細胞培養系における効力と同程度である。細胞培養系における効力のみでは、*in vivo* の効果の信頼できる予測因子とはならない。しかし、これらのデータはヒト SOD 1 発現系におけるトフェルセンのさらなる評価を支持するものである。

2.3　　ヒト SOD1 トランスジェニックマウスにおける用量反応性評価

［4.2.1.1-3］EXP-[redacted]-AA2184、［4.3-27］Gurney 1994、

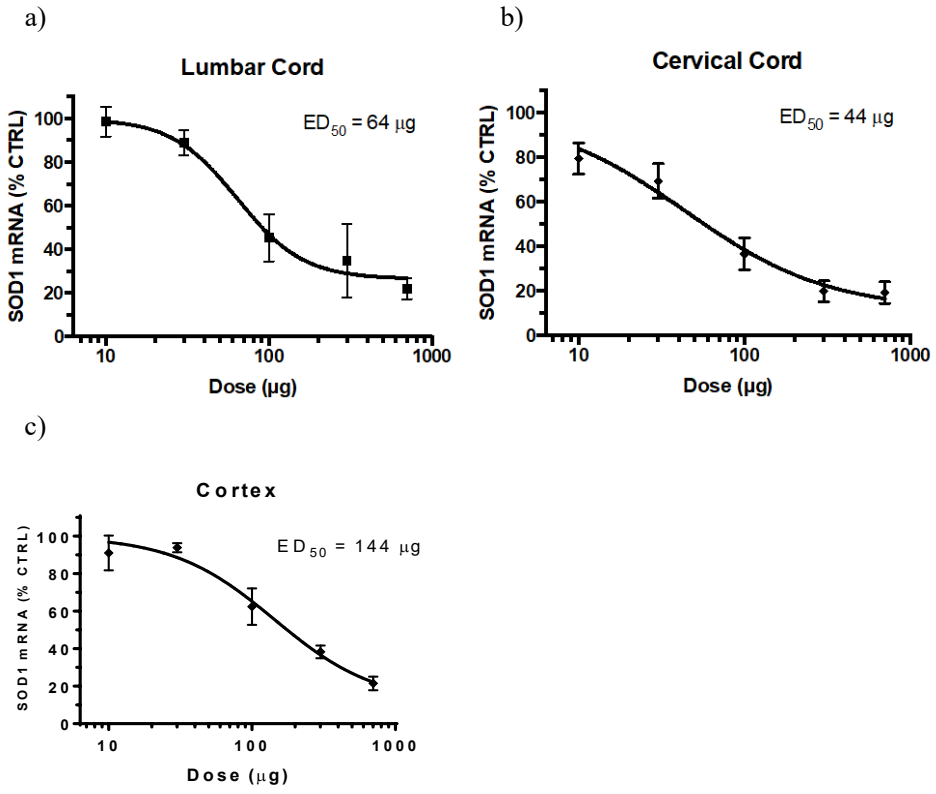
［4.3-35］Kaplan 2014

トフェルセンの *in vivo* の効果を確認するため、トフェルセンの標的となる 3'-UTR を含むヒト SOD1 遺伝子を発現させた C57BL6 マウスを用いた［Gurney 1994］。野生型マウス又はラットでは、トフェルセンの結合部位が保存されていないため、このトランスジェニックマウスモデルを使用

した。このマウスは約 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、これらの発現パターンは主に内因性 SOD 1 遺伝子の発現パターンを反映したものである。実際、このマウスでの運動ニューロンの消失及び保存のパターンは、ヒト ALS 患者での運動ニューロンの消失及び保存のパターンとよく一致している[Kaplan 2014]。このマウスは加齢とともに運動ニューロンの消失及び麻痺を発症するが、この実験では若齢マウスのみを使用した。

全身投与された ASO は血液脳関門を通過しないことから、CNS で SOD1 をノックダウンするためには IT 又は ICV 投与する必要がある。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。1.5 ヵ月齢の SOD1-G93A マウスに溶媒又は 10、30、100、300、又は 700 µg のトフェルセンを ICV 投与した。2 週後に腰髄、頸髄、及び大脳皮質を採取し、SOD1 mRNA 量を qRT-PCR 法で定量した。シクロフィリン mRNA 量を内部標準として用いた。その結果、トフェルセンは用量依存的に SOD1 mRNA を減少させた（図 5）。SOD1-G93A マウスでのヒト SOD1 mRNA の減少に対するトフェルセンの ED_{50} は、頸髄の 44 µg から、大脳皮質の 144 µg の範囲であった。

図 5　SOD1-G93A トランスジェニックマウスにおけるトフェルセン ICV 投与時の SOD1 mRNA 量減少作用（ED_{50}）



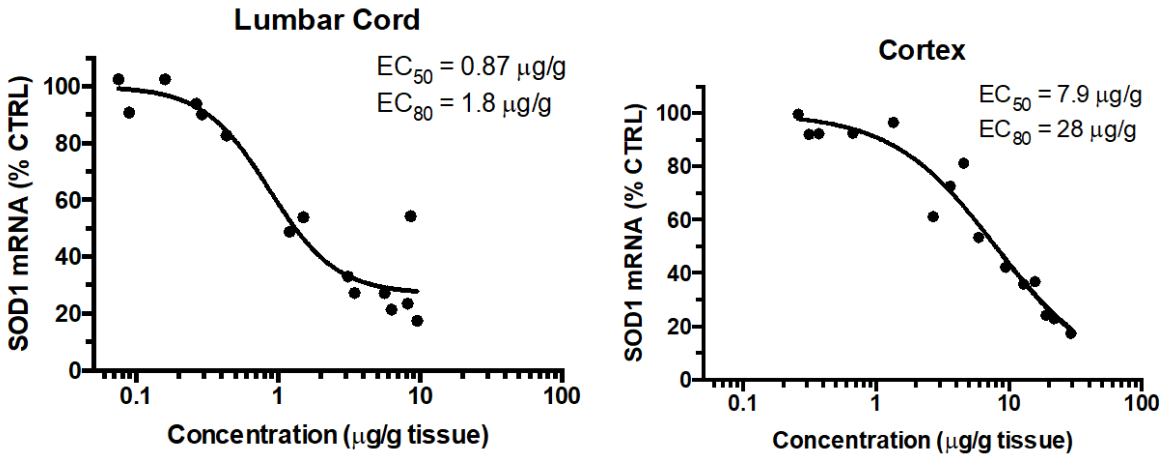
SOD1-G93A トランスジェニックマウスにトフェルセンを ICV ボーラス投与したときの（a）腰髄、（b）頸髄、及び（c）大脳皮質のヒト SOD1 mRNA 量減少作用。ヒト SOD1 mRNA は、ハウスキーピング遺伝子のシクロフィリン mRNA 量で正規化し、溶媒投与群の mRNA 量に対する割合として示した（n = 3、平均値 ± SD、非線形モデルを使用）。
Data source: M4.2.1.1-3_Figure 1

薬物曝露量と SOD1 mRNA 量減少効果の相関をより直接的に調べるために、腰髄及び大脳皮質

中の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）法で測定した。トフェルセンは、SOD1-G93A マウスにおいて、SOD1 mRNA 量を減少させ、EC_{50} は腰髄で 0.87 µg/g、大脳皮質で 7.9 µg/g であった（図 6）。

図 6　　SOD1-G93A トランスジェニックマウスにおけるトフェルセン ICV 投与時の SOD1 mRNA 量減少作用（EC_{50}）

a)　　b)



トフェルセンの ICV ボーラス投与による 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 量をハウスキーピング遺伝子のシクロフィリン mRNA で正規化し、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

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。SOD1-G93A マウスにおいて腰髄と大脳皮質で効力が異なっていたのは、実験のばらつきによる可能性があり、真の差ではないと考えられる。サルにおいて、ASO の活性に CNS 組織の違いによる差は認められていない。実際、各動物種において、部位ごとではなくすべての CNS 組織サンプルを合わせて解析しても妥当な濃度反応曲線が得られたことから、CNS 中トフェルセン濃度が作用発揮のために重要であることが示唆された。なお、トフェルセンの *in vivo* 効果が得られる濃度は、臨床で到達すると考えられる曝露量に一致している（2.5.3.2.1 項）。

2.4　　SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間に対するトフェルセン投与時期の影響

［4.2.1.1-4］ ASO-13

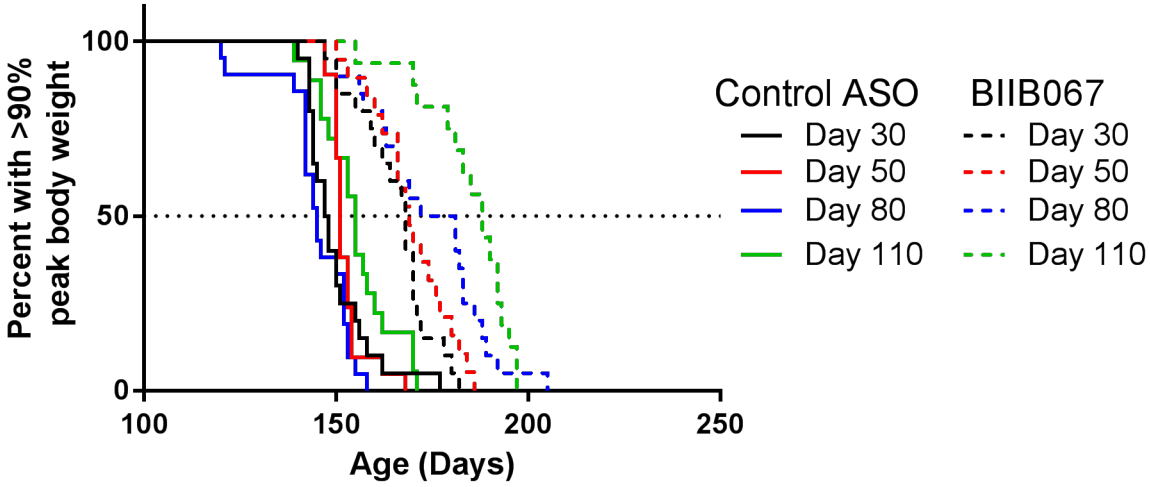
この試験の主な目的は ALS の病態モデルである SOD1-G93A マウスの生存期間に及ぼすトフェルセンの作用に対する投与時期の影響を評価することであった。具体的には、臨床症状発現前の異なる時点のトフェルセンの投与が、臨床症状の発現及び動物の生存期間に影響を及ぼすかどうかを検討した。

78 匹の野生型マウスと 156 匹の SOD1-G93A 雌性マウス（B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)Gur/J; Stock number 304435）を Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から入手した。各遺伝子型のマウス 20 匹を各投与群に使用したが、110 日齢投与群では各遺伝子型の動物 18 匹を使用した。投与は、群

に応じて 30、50、80、又は 110 日齢に各 1 回実施した。トフェルセン又は陰性対照 ASO（300 µg）を ICV ボーラス投与した。SOD1-G93A マウスの疾患発症は、体重を毎日記録することにより盲検下でモニタリングした（10%を超える体重減少を発症とした）。15 秒以内に正向反射がみられなかった場合には安楽死させ、死亡と評価した。

その結果、30、50、80、又は 110 日齢の時点で投与したときの疾患発症までの日数の中央値は、陰性対照 ASO 投与で各々147.5、151、145、及び 155 日、トフェルセン投与で各々168、169、176.5、及び 188 日であった。トフェルセン投与により、陰性対照 ASO 投与群と比較してすべての投与日齢で疾患発症が有意に遅延した（図 7）。

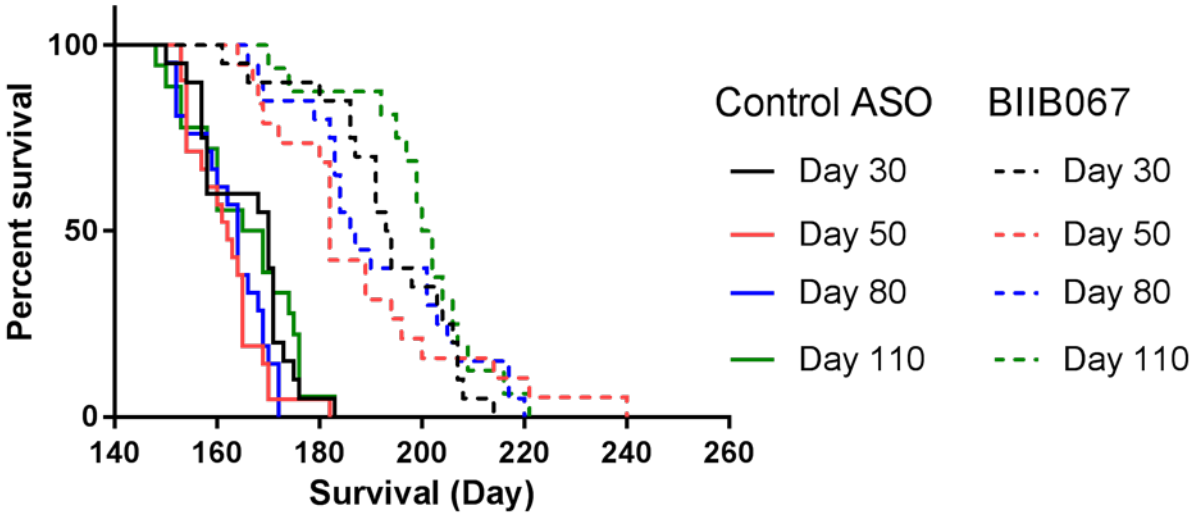
図 7　　SOD1-G93A マウスに種々の時点でのトフェルセンを投与したときの疾患発症までの時間



マウスに陰性対照 ASO 又はトフェルセン（300 µg）を所定の日齢で投与した。トフェルセン投与群のすべての日齢で対照 ASO 投与群との間に有意差が認められた（$p < 0.0001$、Mantel-Cox 検定）。各遺伝子型につき 20 匹のマウスを使用したが、110 日齢投与群では各遺伝子型につき 18 匹を使用した。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 1

30、50、80、又は 110 日齢で対照 ASO を投与したマウスの生存期間の中央値は、それぞれ 170、162、164、及び 167 日であった。トフェルセンを 30、50、80、又は 110 日齢で投与したマウスの生存期間中央値は、それぞれ 193.5、182、186.5、及び 201 日であった。トフェルセンの投与は、陰性対照 ASO 投与群と比較して全投与時期で生存期間が有意に延長した（図 8）。

図 8　　SOD1-G93A マウスに種々の時点でトフェルセンを投与したときの生存期間



マウスに陰性対照 ASO 又はトフェルセン（300 µg）を所定の日齢（30、50、80、又は 110 日齢）で投与した。トフェルセン投与群のすべての日齢で対照 ASO 投与群との間の生存期間で有意差が認められた（$p < 0.0001$、Mantel-Cox 検定）。各遺伝子型につき 20 匹のマウスを使用したが、110 日齢投与群では各遺伝子型につき 18 匹を使用した。
Data source: M4.2.1.1-4_Figure 2

本試験の結果から、疾患の発症時期及び延命効果の程度は全投与群で同程度であり、投与時期がトフェルセンの有効性に有意な影響を及ぼすことはないことが示された。

2.5　SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間及び運動協調性に対するトフェルセンの異なる 2 用量の影響

［4.2.1.1-5］ASO-14

この試験の主な目的は ALS の病態モデルである SOD1-G93A マウスの生存期間及び運動協調性に及ぼすトフェルセンの異なる 2 用量の作用を評価することであった。

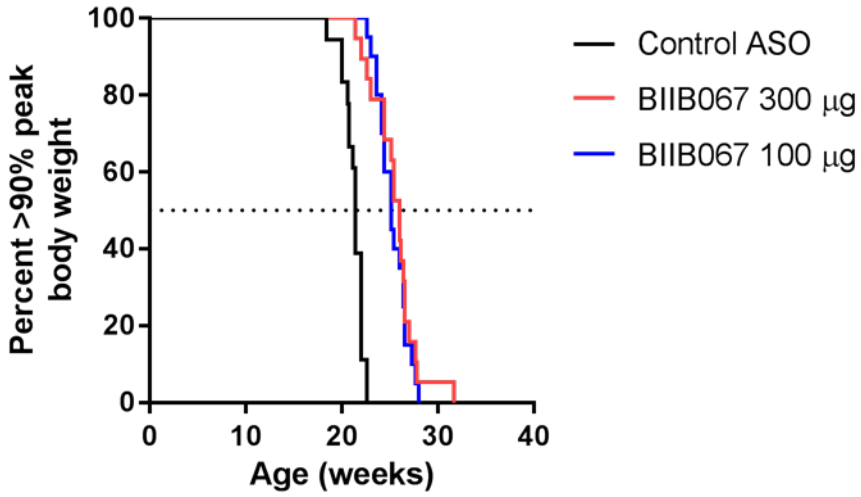
60 匹の雌性 SOD1-G93A マウス（B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)Gur/J、stock number 304435）を Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から入手した。すべてのマウスは導入遺伝子陽性であった。投与群あたり 20 匹のマウスを用い、トフェルセン 100 又は 300 µg を 50 及び 94 日齢時に 2 回 ICV 投与した。

SOD1-G93A マウスの疾患発症は、体重を毎日測定することで、盲検下でモニターした（10%を超える体重減少を発症とした）。15 秒以内に正向反射がみられなかった場合には安楽死させ、死亡と評価した。運動機能を評価するため、マウスをロータロッドに乗せ、2 回転毎分（rpm）から 40 rpm の速度で 180 秒間、40 rpm でさらに 60 秒間回転させた。80 日齢より開始し、少なくとも 30 秒間ロッド上に留まることができなくなるまで、マウスを週に 1 日（及び各試験日に 2 回）試験した。

トフェルセンは疾患発症までの時間の中央値を有意に延長した（陰性対照 ASO : 20 週、トフェ

ルセン 100 µg：25.3 週、トフェルセン 300 µg：26.1 週）（図 9）。

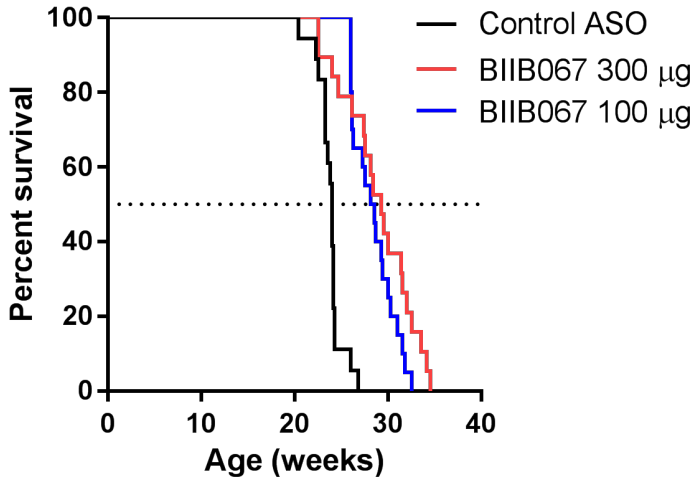
図 9　　SOD1-G93A マウスの疾患発症までの時間に対するトフェルセン 2 用量の作用比較



トフェルセン（100 及び 300 µg）は、疾患発症（10%を超える体重減少）までの期間の中央値を有意に延長させた（$p < 0.0001$、Mantel-Cox 検定）（陰性対照 ASO：20 週；トフェルセン 100 µg：25.3 週；トフェルセン 300 µg：26.1 週）。
Data source: M4.2.1.1-5_Figure 1

マウスに陰性対照 ASO を投与したときの生存期間の中央値は 24 週であったが、トフェルセン 100 又は 300 µg の投与による生存期間の中央値は、それぞれ 28.3 及び 29.3 週に延長した（図 10）。

図 10　　SOD1-G93A マウスの生存期間に対するトフェルセン 2 用量の作用比較

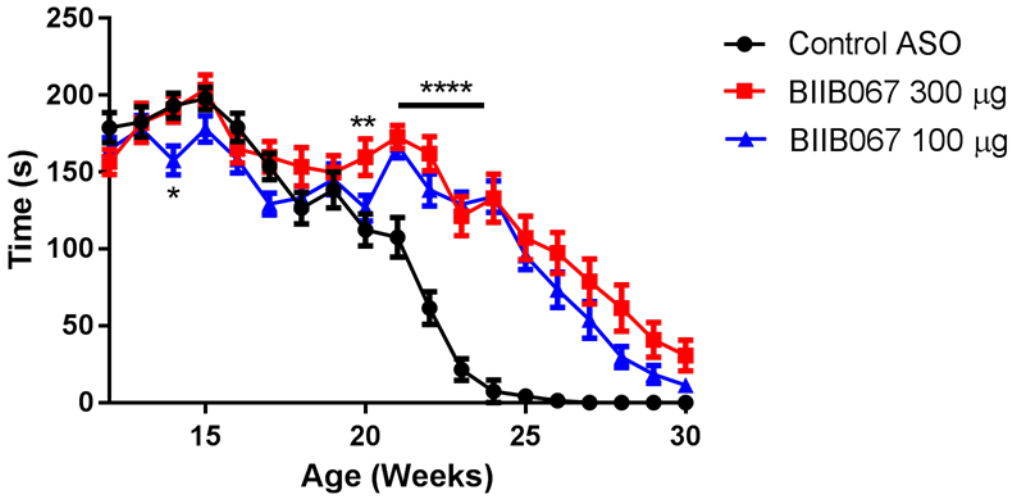


陰性対照 ASO 投与群のマウスの生存期間の中央値は 24 週であったが、トフェルセン 100 及び 300 µg 投与群のマウスの生存期間中央値はそれぞれ 28.3 及び 29.3 週に延長した（$p < 0.0001$、Mantel-Cox 検定）。各群 20 匹のマウスを使用した。
Data source: M4.2.1.1-5_Figure 2

トフェルセン 100 µg 投与群と 300 µg 投与群における運動機能は同程度に改善した。トフェルセンを投与した動物は、いずれの投与群でも 21 週齢以降、陰性対照投与群と比較して、有意にロ

ータロッドに長時間留まることができた（図 11）。

図 11　SOD1-G93A マウスの運動協調性（ロータロッド法）に対するトフェルセン 2 用量の作用比較



トフェルセン（100 及び 300 µg）は、運動協調性に同程度の影響を及ぼした（n = 18~20、各値は平均値 ± 標準誤差［SE］を示す）。トフェルセン投与群の SOD1-G93A マウスが所定の週齢でロータロッド上に留まることができた平均時間を、陰性対照 ASO 投与群の SOD1-G93A マウスと比較した平均時間の差について、有意差を検定した（二元配置分散分析、*100 µg と陰性対照投与群との間で $p < 0.05$、**300 µg 投与群と陰性対照投与群との間で $p < 0.01$、****100 µg と 300 µg の両投与群と陰性対照投与群との間で $p < 0.0001$）。
Data source: M4.2.1.1-5_Figure 3

前項の試験（ASO-13 試験、2.4 項）で、トフェルセンは疾患進行中に投与した場合でも生存期間の延長効果を示すことが確認されている。本試験では SOD1-G93A マウスに対する生存期間の延長効果が確認された。また、トフェルセンは SOD1-G93A マウスの運動協調性を保護することも示された。

2.6　SOD1-G93A マウスにおけるトフェルセンの作用を検討する電気生理学的及び組織学的試験

［4.2.1.1-6］ASO-15

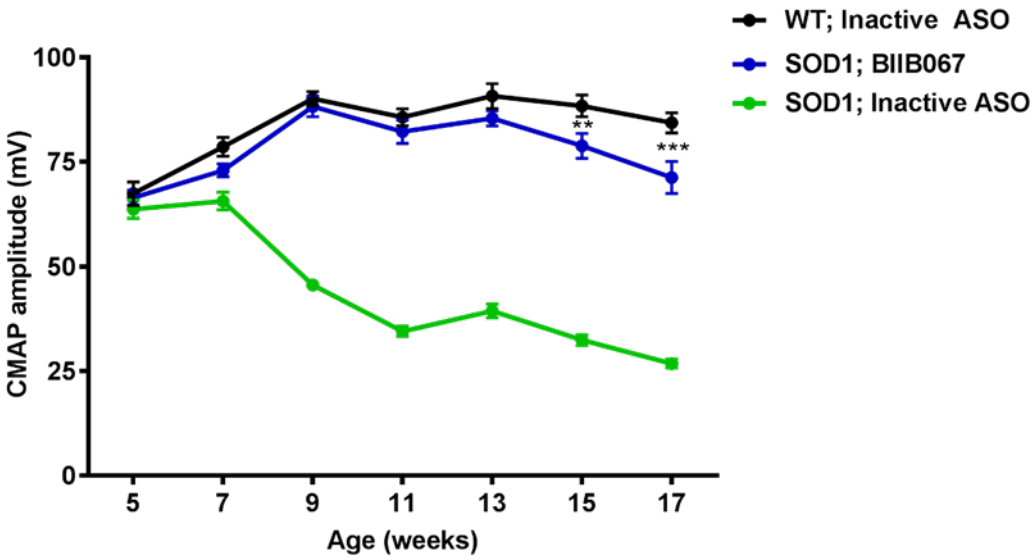
本試験の主な目的は、単回投与のトフェルセンによる電気生理学的及び組織学的評価項目に対する影響を検討することであった。

84 匹の雌性 SOD1-G93A トランスジェニックマウス（B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)Gur/J; stock number 304435）と 48 匹の雌性野生型同腹児を Jackson Laboratory（Harbor、ME）から入手した。雌性 SOD1-G93A マウスの 35 日齢にトフェルセン 300 µg の ICV 単回投与した。

筋機能及び神経支配を前脛骨筋の複合筋活動電位（CMAP）記録及び免疫染色による神経筋接合部（NMJ）定量によりそれぞれ評価した。また、筋線維の大きさと同型の筋線維のクラスター化も組織染色により評価し、画像分析と Visiopharm ソフトウエアによる定量化を行った。

CMAP の結果から、トフェルセンは SOD1-G93A マウスの筋機能の喪失を予防するのに有用であった。トフェルセン投与群の SOD1-G93A マウスの CMAP は、陰性対照 ASO 投与群の SOD1-G93A マウスと比較して、7 週目から 17 週目まで有意に増加した。トフェルセン投与群の CMAP は、15 及び 17 週目を除き、野生型での CMAP と有意な差はなかった（図 12）。

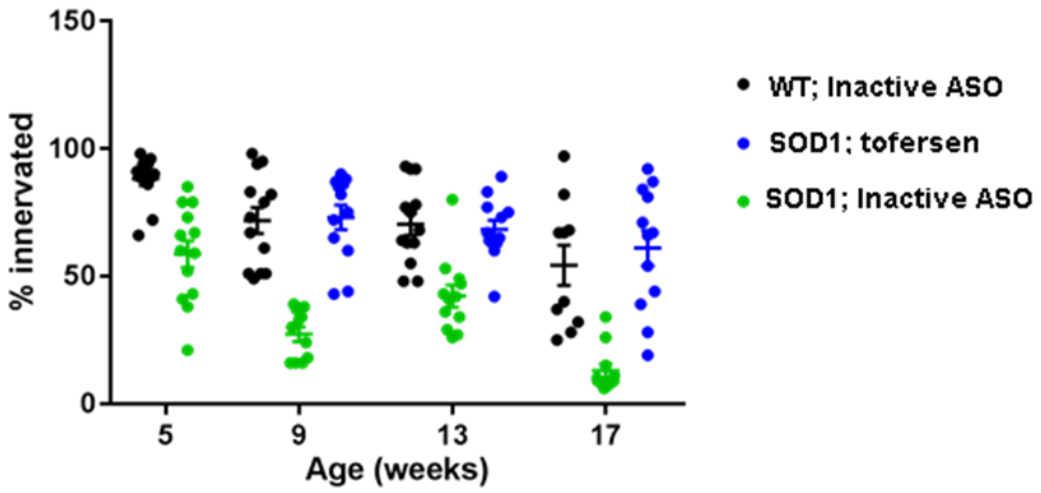
図 12　　SOD1-G93A マウスの神経筋機能（CMAP）に対するトフェルセン単回投与の作用



トフェルセン 300 µg 投与群（BIIB067）は、陰性対照 ASO 投与群（Inactive ASO）と比較して有意な治療効果を示すことが確認された（7 週齢から 17 週齢で有意）。15 週齢及び 17 週齢を除き、トフェルセン投与群の CMAP は野生型（WT）の CMAP と有意差はなかった（n = 12、**p = 0.009 及び***p = 0.0002、二元配置分散分析）。
Data source: M4.2.1.1-6_Figure 1

トフェルセン投与は、SOD1-G93A マウスの前脛骨筋における NMJ 喪失を抑制した。検討したすべての週齢で陰性対照 ASO を投与した WT マウスと陰性対照 ASO を投与した SOD1-G93A マウスの間で NMJ 数に有意差があったが、トフェルセンを投与した SOD1-G93A マウスは WT と比べて有意差を示さなかった（図 13）。

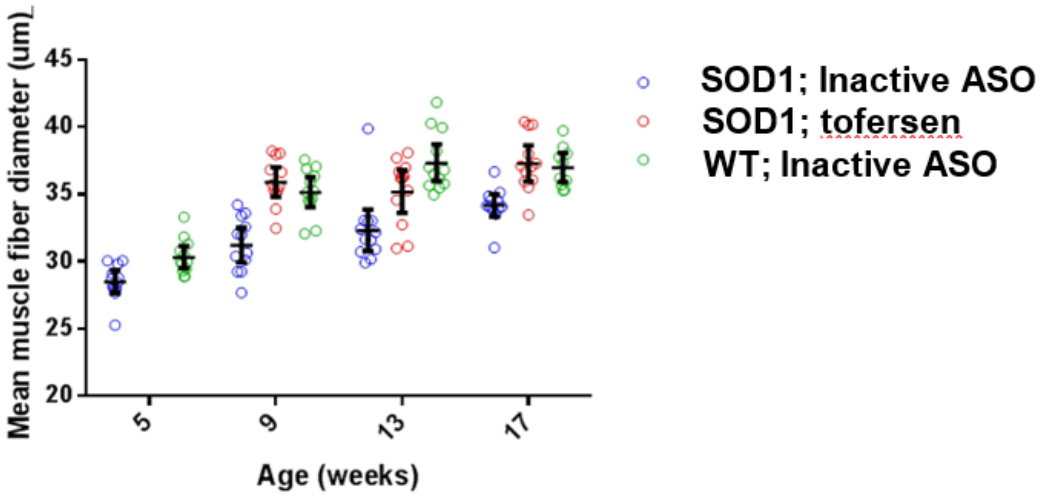
図 13　SOD1-G93A マウスの神経筋接合性（NMJ 数）に対するトフェルセン単回投与の作用



トフェルセン（300 µg）は、SOD1-G93A マウスにおける前脛骨筋の NMJ 喪失を有意に抑制した。検討したすべての週齢で陰性対照 ASO を投与した野生型（WT）マウスと陰性対照 ASO 投与した SOD1-G93A（SOD1; Inactive ASO）マウスの間で NMJ 数に有意差があった。トフェルセンを投与した SOD1-G93A マウス（SOD1; tofersen）は WT と比べて有意差を示さなかった（二元配置分散分析）。
Data source: M4.2.1.1-6_Figure 2

トフェルセンは、前脛骨筋の筋線維径によって測定した筋線維萎縮を抑制した。効果は 9 週齢より認められ、17 週齢まで持続した（図 14）。

図 14　SOD1-G93A マウスの筋線維萎縮（前脛骨筋の筋線維径）に対するトフェルセン単回投与の作用

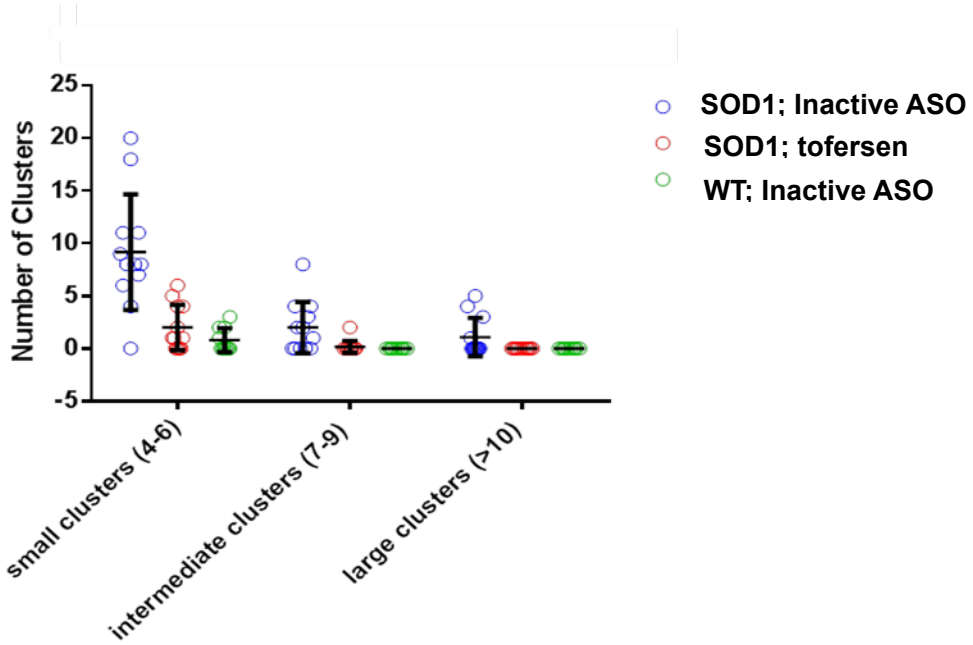


トフェルセン（300 µg）投与群の SOD1-G93A（SOD1; tofersen）の筋線維径は、陰性対照投与群の SOD1-G93A（SOD1; Inactive ASO）と比較して増加し、野生型（WT; Inactive ASO）で認められた値と同程度であった。トフェルセンの作用は 9、13、及び 17 週齢の動物で認められた。
Data source: M4.2.1.1-6_Figure 3

トフェルセン投与は SOD1-G93A マウスのヒラメ筋の線維型組成を改善した。骨格筋における線維型クラスター化は脱神経からその後の生存運動ニューロンによる再神経支配を反映する。脱

神経により、SOD1-G93A マウスのヒラメ筋における遅筋型ミオシン陽性線維クラスターの数が増加した。トフェルセンを投与した SOD1-G93A マウスでは、陰性対照 ASO 投与マウスと比較して遅筋型線維クラスター数の減少が認められた。トフェルセン投与マウスにおける遅筋型線維クラスターの数は、野生型マウスと同程度であった（図 15）。

図 15　　SOD1-G93A マウスのヒラメ筋における脱神経（筋線維型クラスター分析）に及ぼすトフェルセン単回投与の作用



5 週齢のマウスに陰性対照 ASO（SOD1; Inactive ASO）又は 300 µg トフェルセン（SOD1; tofersen）を単回投与した。ヒラメ筋を 17 週齢で採取した。トフェルセン投与群の SOD1-G93A マウスでは、遅筋線維クラスター数が野生型（WT; Inactive ASO）と同程度に減少した。
Data source: M4.2.1.1-6_Figure 4

この試験では、トフェルセンを単回 ICV 投与したときの神経筋単位構造及び電気的機能に対する作用を評価した。CMAP 並びに前脛骨筋の NMJ 数と筋線維径及びヒラメ筋の筋線維組成の定量を含む各種の組織学的評価項目について縦断的に定量評価した。本解析の結果から、トフェルセンは神経筋の構造及び機能を有意に保護することが示された。

2.7　　SOD1-G93A マウスに対する効果の組織学的検討

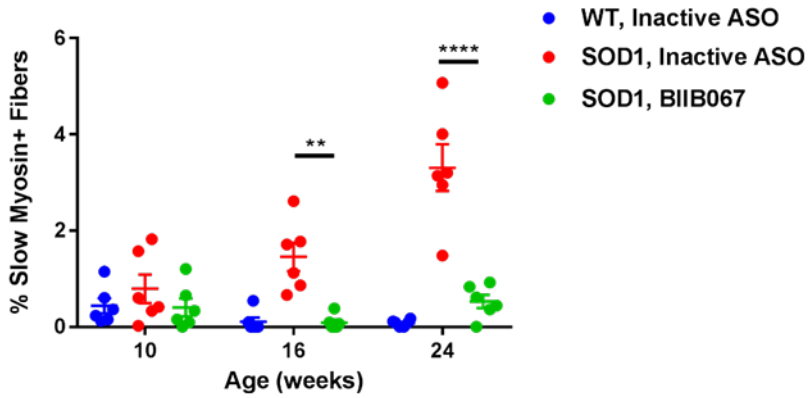
［4.2.1.1-7］ASO-27

本試験の主な目的は、ALS の病態モデルである SOD1-G93A マウスを用いて、種々の組織学的評価項目に及ぼすトフェルセンの反復投与（2 回投与）の作用を評価することであった。

36 匹の雌性 SOD1-G93A トランスジェニックマウス（B6.Cg-Tg(SOD1*G93A Gur/J); stock number 304435）及び 18 匹の雌性野生型同腹児を Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME）から入手した。トフェルセン投与により、筋線維組成に効果を示し、脊髄の炎症を抑制することができるかを示すため、雌性 SOD1-G93A マウスにトフェルセン 100 µg を 50 及び 94 日齢時に 2 回 ICV 投与した。

トフェルセンの反復投与により、SOD1-G93A マウスの前脛骨筋における遅筋型ミオシン陽性線維への変換を阻害した。前項で述べたように、SOD1-G93A マウスでは、速筋型ミオシン陽性線維から遅筋型ミオシン陽性線維への変換は、脱神経からその後の生存している運動ニューロンによる神経再支配を反映する［Gurney 1994］。トフェルセンを投与した SOD1-G93A マウスでは、16 週齢及び 24 週齢のいずれにおいても、SOD1 陰性対照 ASO 投与群と比較して、遅筋型ミオシン陽性線維数の割合の有意な減少が認められた（図 16）。

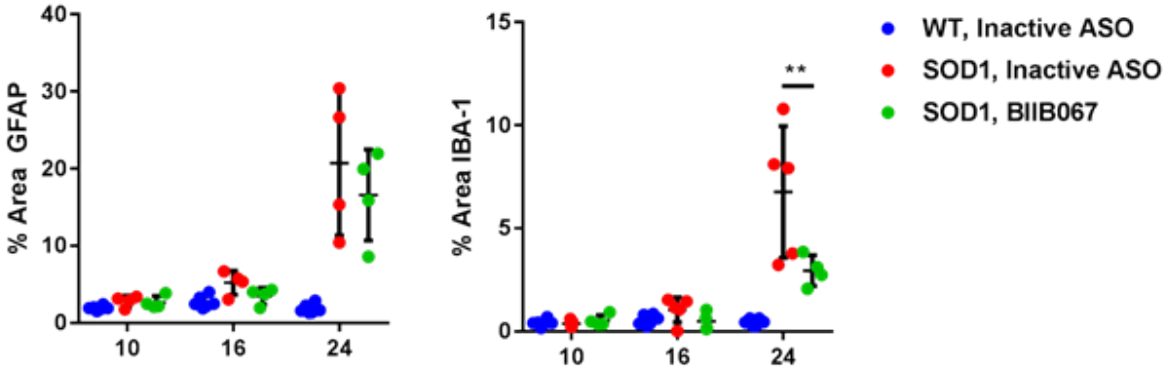
図 16　　SOD1-G93A マウスの前脛骨筋の遅筋型ミオシン陽性線維の割合に対するトフェルセン 2 回投与の作用



トフェルセン（SOD1, BIIB067）を投与した SOD1-G93A マウスの前脛骨筋の遅筋型ミオシン陽性線維の数は、Inactive ASO 群（SOD1, Inactive ASO）と比較して、16 週齢時（$p = 0.005$）及び 24 週齢時（$p < 0.0001$）の両時点て有意に減少した（二元配置分散分析）。10 週齢群ではトフェルセンを 1 回投与し、16 及び 24 週齢群では 2 回投与した。
Data source: M4.2.1.1-7_Figure 1

トフェルセンの反復投与は、SOD1-G93A マウスの脊髄における神経炎症マーカーのレベルを低下させた。GFAP は有意に低下しなかったが、IBA-1 は 24 週齢で有意に低下した（図 17）。

図 17　　SOD1-G93A マウスの脊髄の炎症マーカーに対するトフェルセン 2 回投与の作用



トフェルセン（SOD1, BIIB067）又は対照 ASO（SOD1, Inactive ASO）を投与した SOD1-G93A マウス及び野生型マウス（WT, Inactive ASO）の脊髄における GFAP 及び IBA-1 染色量を 10、16、及び 24 週齢で定量した。GFAP は対照投与マウスと比較してトフェルセン投与 SOD1-G93A マウスで有意に低下しなかったが（$p > 0.05$）、IBA-1 は 24 週齢で有意に低下した（$p = 0.002$、二元配置分散分析）。10 週齢群ではトフェルセンを 1 回投与、16 及び 24

週齢群では 2 回投与した。
Data source: M4.2.1.1-7_Figure 2

この試験では、トフェルセンを 2 回 ICV 投与することにより、前脛骨筋の脱神経による線維型転換が有意に抑制されることが示された。さらに、トフェルセンは脊髄ミクログリアの活性化レベルを有意に低下させたことから、CNS の炎症に対して保護作用を示すことが示唆された。

2.8 SOD1-G93A マウスにおけるトフェルセンの効果の用量反応性解析

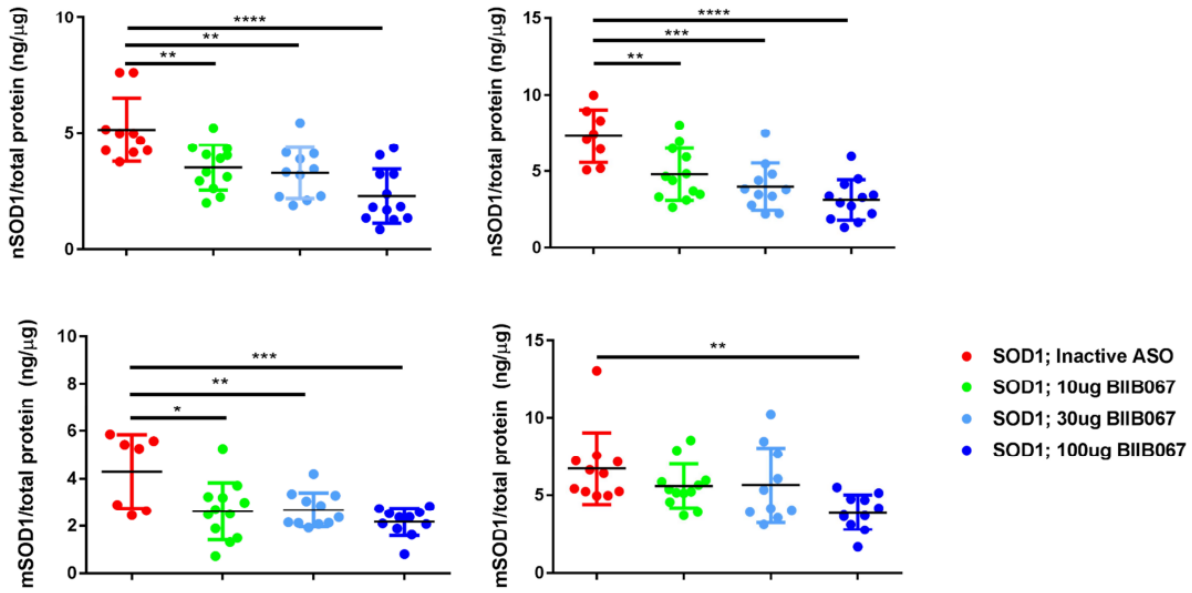
［4.2.1.1-8］ASO-28

この試験の主な目的は、SOD1-G93A マウスにおける複数の生理学的及び生化学的な評価項目に対するトフェルセンの漸増用量による作用を評価することであった。

SOD1-G93A マウスに陰性対照 ASO、トフェルセン 10、30 又は 100 µg を 35 日齢（5 週齢）に投与し、70 日齢まで評価した。この試験では、SOD1-G93A マウスにトフェルセンを投与すると、1）CNS 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）前脛骨筋における神経筋機能（CMAP）の用量依存的な保護作用、3）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）濃度の有意かつ用量依存的な減少が示された。

トフェルセン投与により、SOD1-G93A マウスの皮質及び腰髄における野生型及びミスフォールド SOD1 タンパク質濃度が減少した。陰性対照 ASO 又はトフェルセンの漸増用量を投与した SOD1-G93A マウスの組織を用いて、野生型及びミスフォールド SOD1 タンパク質濃度を測定した。トフェルセンのすべての用量で、陰性対照投与群と比較して皮質及び腰髄の両方で野生型 SOD1（nSOD1）が有意に減少した。この作用は用量依存的であった。ミスフォールド SOD1（mSOD1）も皮質で用量依存的に有意な減少を示したが、腰髄では 100 µg 投与群のみが有意な作用を示した（図 18）。

図 18　　SOD1-G93A マウスの大脳皮質及び腰髄における野生型又はミスフォールド SOD1 タンパク質濃度に対するトフェルセンの用量依存的作用

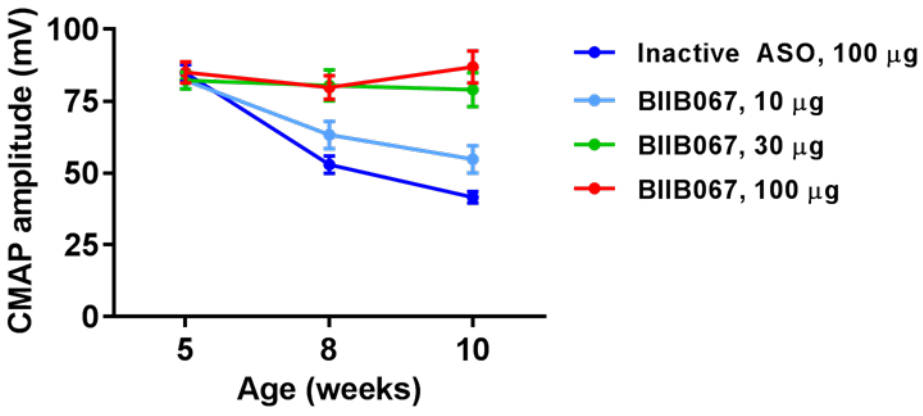


左図：大脳皮質、　　右図：腰髄

トフェルセンのすべての用量（SOD1; 10、30、100 μg BIIB067）は、陰性対照 ASO 投与群（SOD1; Inactive ASO）と比較して、皮質及び腰髄の野生型 SOD1 を有意に減少させた（nSOD1、上段）（$p < 0.01$）。トフェルセンのすべての用量は皮質におけるミスフォールド SOD1（mSOD1、下段）を有意に減少させた（$p < 0.01$）。腰髄の mSOD1 はトフェルセン 100 μg 投与群（SOD1; 100 μg）でのみ有意に減少した（$p < 0.01$）。3 投与群間で統計学的有意差は認められなかった。
統計解析は二元配置分散分析により行った（*$p < 0.05$、**$p < 0.01$、***$p < 0.001$、****$p < 0.0001$［vs 陰性対照 ASO 投与群］）。
Data source: M4.2.1.1-8_Figure 1

トフェルセン投与は、用量依存的に CMAP 測定による前脛骨筋機能を改善した。SOD1-G93A マウスにおいて、トフェルセン 30 及び 100 μg の投与群では、陰性対照 ASO 投与群と比較して 8 及び 10 週齢時の CMAP を有意に改善したが、10 μg 投与群では改善しなかった。（図 19）。

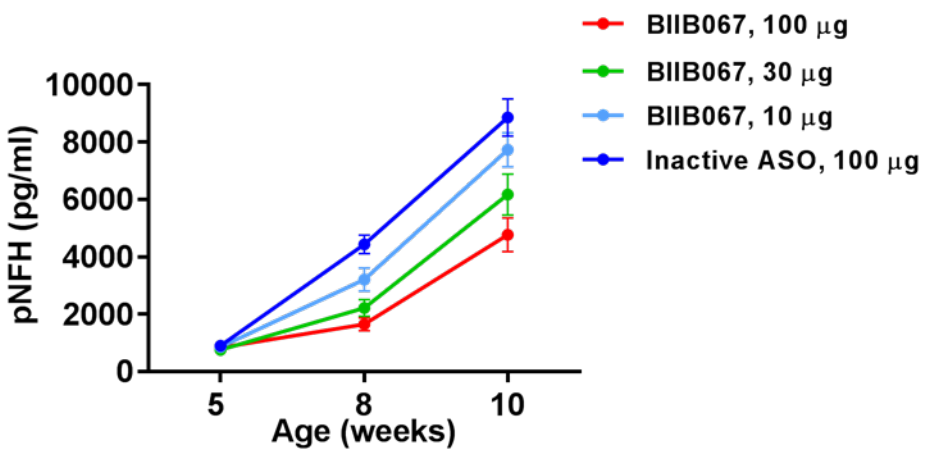
図 19　　SOD1-G93A マウス前脛骨筋の CMAP に対するトフェルセンの用量依存的作用



トフェルセン 30（BIIB067, 30 µg）及び 100 µg（BIIB067, 100 µg）のボーラス投与により、8 及び 10 週齢時の CMAP は陰性対照投与群（Inactive ASO）と比較して有意に改善したが（$p < 0.0001$）、10 µg（BIIB067, 10 µg）では改善しなかった。30 µg 投与群及び 100 µg 投与群の両群で、10 µg 投与群と比較して 8 週齢（$p < 0.05$）及び 10 週齢（$p < 0.0005$）の両時点で有意な改善が認められた。8 週齢及び 10 週齢のいずれにおいても、30 µg 投与群と 100 µg 投与群との間に有意差は認められなかった。統計解析は二元配置分散分析により行った（$n = 10〜12$）。
Data source: M4.2.1.1-8_Figure 2

トフェルセンの投与により、SOD1-G93A マウスの血清中 pNfH 濃度を用量依存的に低下させた。SOD1-G93A マウスの 8 週齢及び 10 週齢時の血清中 pNfH 濃度は、30 及び 100 µg のトフェルセン投与により、陰性対照投与群と比較して有意に減少したが、10 µg 投与では減少しなかった（図 20）。

図 20　　SOD1-G93A マウスの血清中 pNfH 濃度に対するトフェルセンの用量依存的作用



8 及び 10 週齢時の血清中 pNfH 濃度は、トフェルセン 30（BIIB067, 30 µg）及び 100 µg（BIIB067, 100 µg）投与により、陰性対照 ASO 投与（Inactive ASO, 100 µg）と比較して有意に低下したが（$p < 0.001$）、10 µg（BIIB067; 10 µg）投与では低下しなかった。8 週齢の時点では、10 及び 100 µg の用量間のみで有意差（$p < 0.05$）が認められた。一方、10 週齢の時点では、すべての用量間で有意差が認められた（10 µg vs. 30 µg：$p < 0.05$、10 µg vs. 100 µg：$p < 0.0001$、30 µg vs. 100 µg：$p < 0.05$）
統計解析は、二元配置分散分析により行った（$n = 11〜12$）。
Data source: M4.2.1.1-8_Figure 3

前述した試験において、トフェルセンは SOD1-G93A マウスの生存期間を延長し、生理学的機能を改善することが示された（2.4 項、2.5 項、及び 2.6 項）。この試験では、トフェルセン投与により SOD1-G93A モデルの疾患進行を抑制することは、前脛骨筋の CMAP 及びの血清中 pNfH 濃度の測定により確認された。検討した 3 用量すべてで、CNS における野生型及びミスフォールド SOD 1 タンパク質濃度が有意に低下した。しかし、CMAP 及び血清中 pNfH 濃度に有意な作用を示したのは 30 及び 100 µg のみであった。さらに、この 2 用量間に統計学的な有意差は認められないことから、トフェルセン 30 µg を SOD 1 関連疾患の表現型の改善における最高用量とするのが妥当であることが示唆された。

2.9　　ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける用量反応性評価

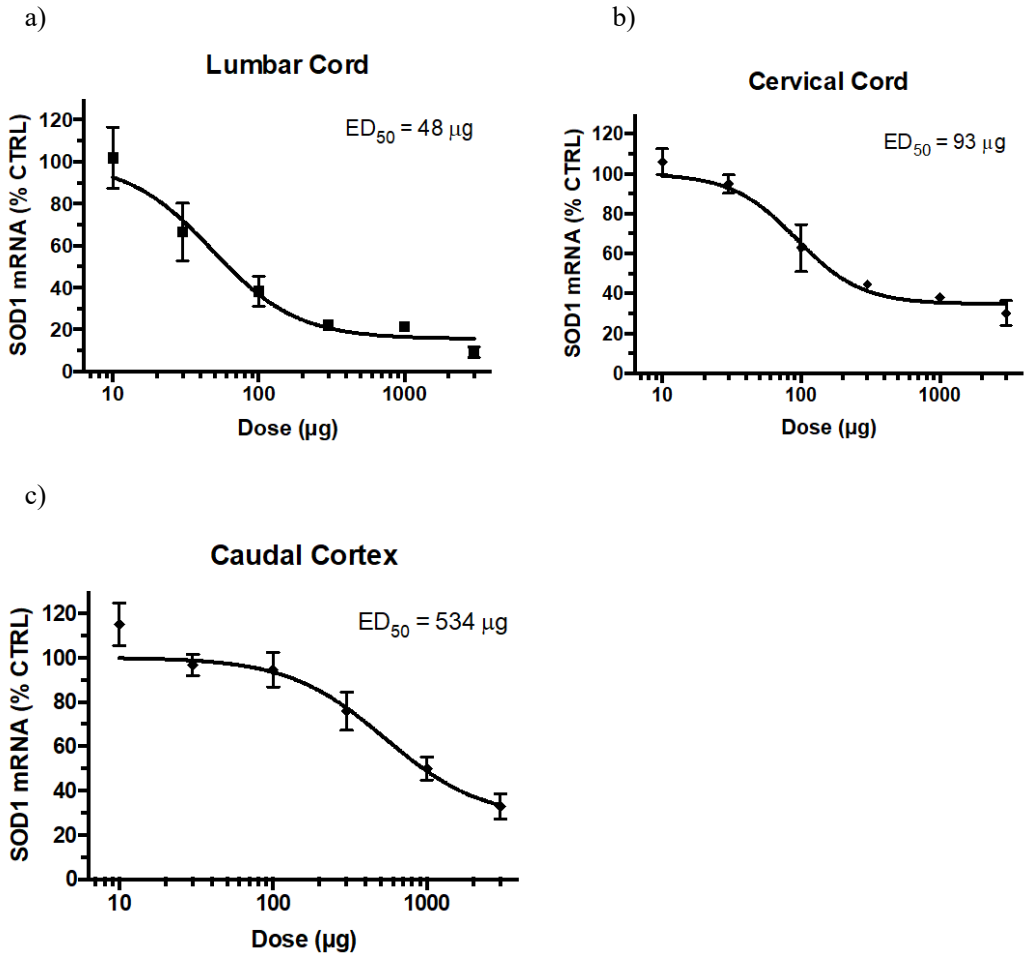
［4.2.1.1-9］EXP-[redacted]-AA2185、［4.3-32］Howland 2002

本試験の主な目的は、IT 投与後のラット CNS におけるトフェルセンの組織内濃度と SOD1 mRNA 量の用量反応関係を検討することであった。本試験でラットを使用した主な理由は、

マウスよりもサイズが大きいことから、CSF 試料採取が容易であることであった。ラットモデルは、マウスモデルと同様に、トフェルセン結合部位である 3'-UTR を含む G93A 変異を有する完全長ヒト SOD1 遺伝子を過剰発現している［Howland 2002］。CSF 中 SOD 1 の測定は有用な PD マーカーになる可能性があるため、CSF を採取して測定することが重要であった。

1～2 ヵ月齢の SOD1-G93A ラットに溶媒又は 10、30、100、300、1000、又は 3000 µg のトフェルセンを IT 投与した。2 週後に CNS 組織を採取し、SOD1 mRNA 量を定量し、正規化対照のシクロフィリン mRNA 量と比較した（図 21）。

図 21　SOD1-G93A ラットにトフェルセン IT ボーラス投与したときの種々の領域における SOD1 mRNA 量減少作用（ED_{50}）



SOD1-G93A ラットにトフェルセンの漸増用量（10、30、100、300、1000、又は 3000 µg）で IT ボーラス投与した。ヒト SOD 1 mRNA 量を（a）腰髄、（b）頸髄、及び（c）大脳皮質尾側部で定量した。SOD1 mRNA 量をハウスキーピング遺伝子のシクロフィリン mRNA で正規化し、溶媒対照投与群に対する割合として示した。ED_{50} は腰髄で 48 µg、頸髄で 93 µg、大脳皮質で 534 µg と算出された。各プロットは、平均値 ± SD（n = 3～4）を示し、非線形回帰分析でフィットさせた。
Data source: M4.2.1.1-9_Figure 1

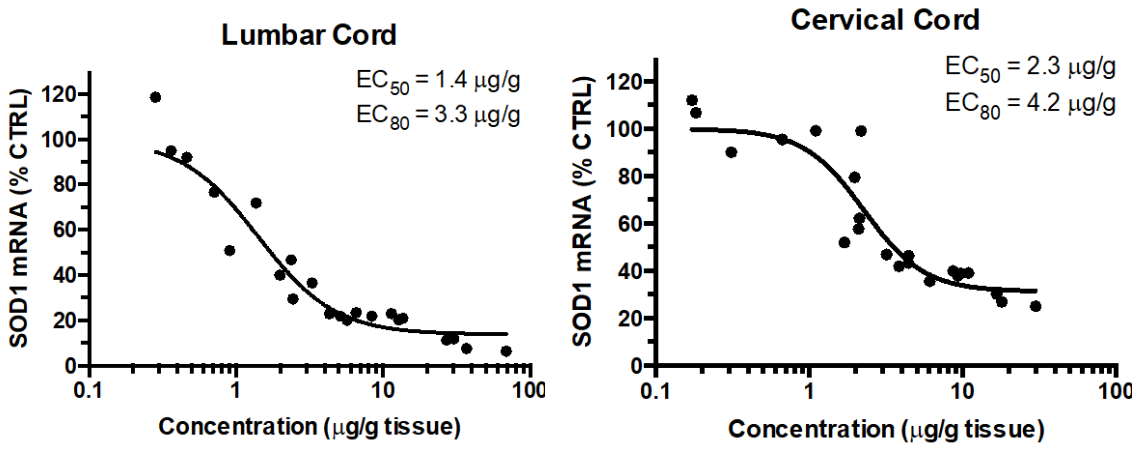
ラット CNS の 3 領域（腰髄、頸髄、及び大脳皮質尾側部）における mRNA 量の減少を評価した。感受性に差はみられたものの SOD1 mRNA 量は 3 領域すべてにおいて用量依存的な減少を示した。ED_{50} は腰髄における 48 µg から大脳皮質尾側部における 534 µg の範囲であった。

マウスの試験（2.3 項）と同様に、トフェルセンの組織内濃度と SOD1 mRNA 量との関係を検討した。腰髄及び頸髄における薬物濃度をハイブリダイゼーション ELISA 法で定量した。この分析において、トフェルセンは SOD1 mRNA 量を減少させることが示され、EC_{50} は腰髄で 1.4 µg/g、頸髄で 2.3 µg/g であった（図 22）。算出されたこれらの値はマウスの腰髄における EC_{50} と同程度であった。

この試験により、げっ歯類における 2 つ目のモデルでのトフェルセンの *in vivo* 活性の評価が得られるとともに、ラット病態モデルを用いたその後の試験（2.10 項）により、CNS における SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度の減少と CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の減少との関係を理解することができた。

図 22　SOD1-G93A ラットにトフェルセン IT ボーラス投与したときの SOD1 mRNA 量減少作用（EC_{50}）

a)　　b)



SOD1-G93A トランスジェニックラットにトフェルセンを IT ボーラス投与したときの EC_{50} は、(a) 腰髄で 1.4 µg/g、（b）頸髄で 2.3 µg/g であった。ヒト SOD 1 mRNA 量は、ハウスキーピング遺伝子のシクロフィリン mRNA で正規化し、対照（PBS）投与群に対する割合として示した。各シンボルは個々の動物を表す。濃度-反応曲線は、非線形回帰分析でフィットさせた。
Data source: M4.2.1.1-9_Figure 2

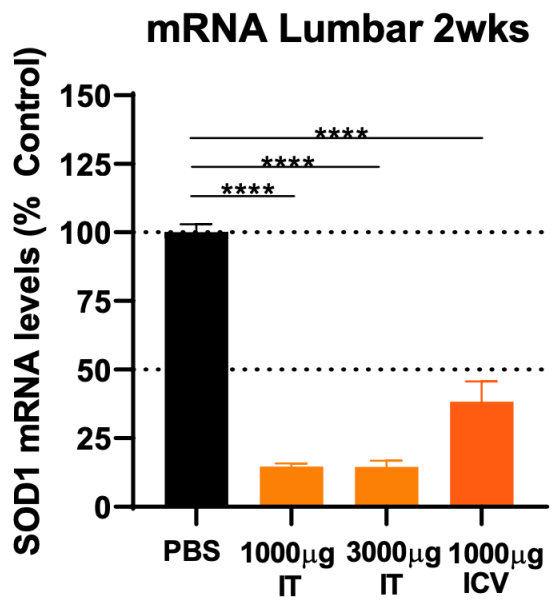
2.10　ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度の減少作用

［4.2.1.1-10］EXP-[redacted]-AA2186、［4.3-19］Farr 2011

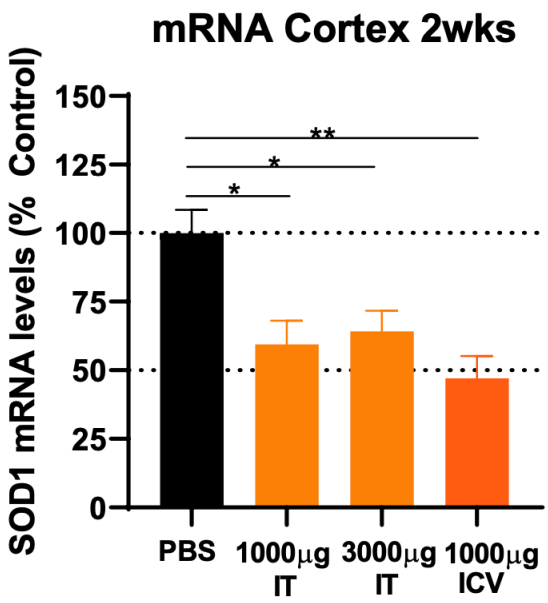
トフェルセンは、2.9 項で示されたように、ラット CNS において SOD1 mRNA を減少させることが可能である。SOD1-G93A ラットにトフェルセンを IT 又は ICV 投与し、CNS 及び CSF における mRNA 量減少の持続時間及び／又は SOD1 タンパク質濃度の経時変化を検討した。IT 投与では 1000 及び 3000 µg の 2 用量を投与した。ICV 投与は 1000 µg のみで行った。組織中 mRNA 量及びタンパク質濃度分析のために、投与 2、4、及び 8 週後に組織を採取した。2 週後、IT 投与及び ICV 投与のいずれにおいても、SOD1 mRNA の有意な減少が認められた（図 23）。トフェルセン投与の 3 投与群すべてで平均 50%以上の減少が認められ、前述した用量反応性（2.9 項）の結果と一致した。

図 23　トフェルセン IT 又は ICV ボーラス投与 2 週後の腰髄及び大脳皮質吻側部における SOD1 mRNA 量の減少作用

A.



B.

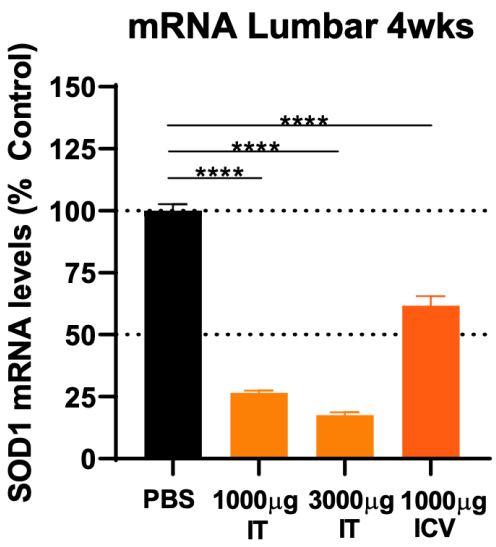


トフェルセンの IT（1000 及び 3000 µg）又は ICV（1000 µg）投与により、投与 2 週後には（A）腰髄及び（B）大脳皮質吻側部におけるヒト SOD1 mRNA 量は PBS 投与ラットと比較して有意に減少した。SOD1 mRNA 量は溶媒対照（PBS）に対する割合として示した（平均値 ± SE、n = 4～5）。腰髄 RNA で ROUT 解析により除外された外れ値は群平均には含めなかった。
統計解析は、一元配置分散分析後に Tukey の多重比較検定を行った。*p < 0.05、***p < 0.001、****p < 0.0001
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 1

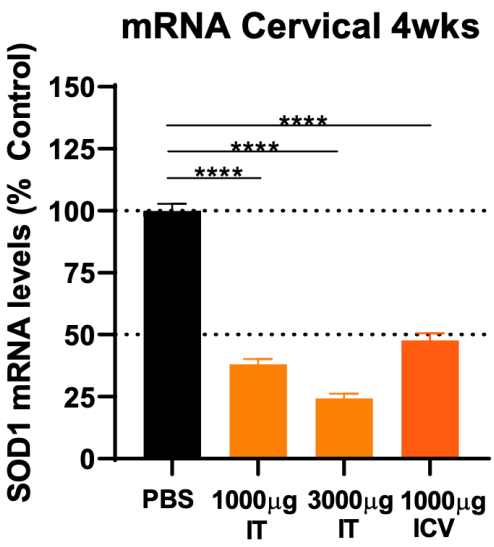
投与 4 週後の検討においても、トフェルセンの 3 投与群すべてで SOD1 mRNA 量の持続的な減少が認められた（図 24）。脊髄では 3 投与群すべて、大脳皮質では IT の高用量投与群及び ICV 投与群で、SOD1 mRNA 量の有意な減少が投与 8 週後まで持続した（図 25）。これは修飾オリゴヌクレオチドの組織クリアランスが緩徐であることに一致する。

図 24　　トフェルセン IT 又は ICV ボーラス投与 4 週後の腰髄、頸髄、及び大脳皮質吻側部における SOD1 mRNA 量減少作用

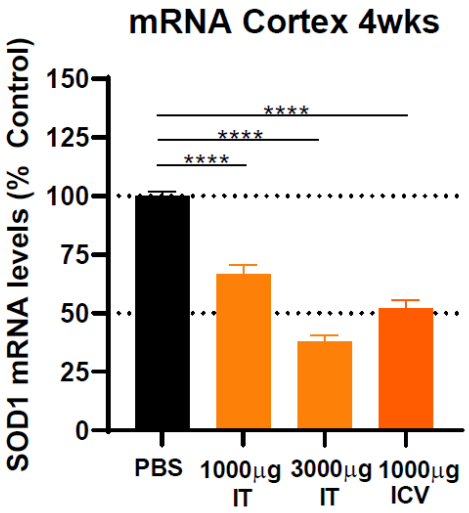
A.



B.



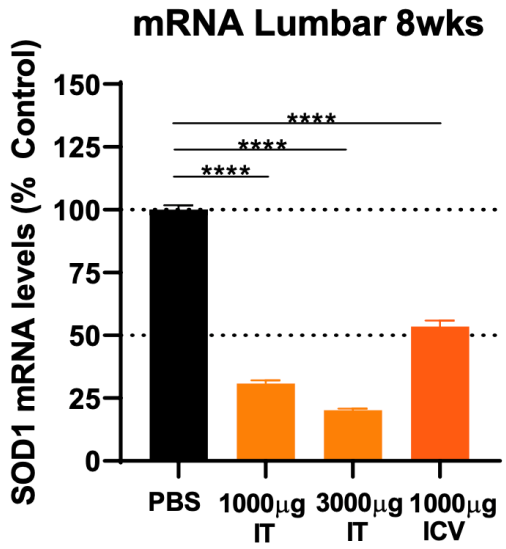
C.



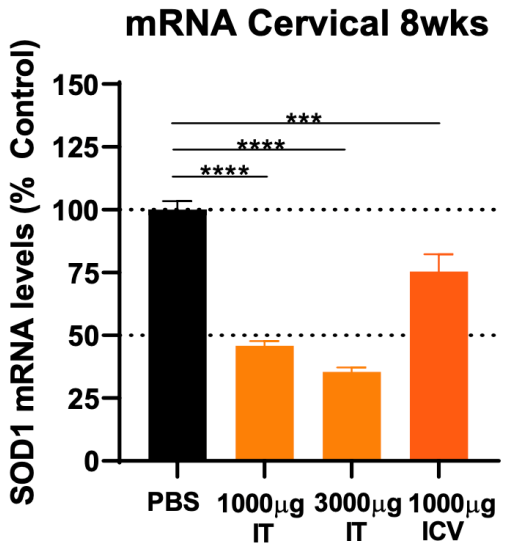
トフェルセンの IT（1000 及び 3000 µg）又は ICV（1000 µg）のボーラス投与は、PBS 投与群と比較し、投与 4 週後では、（A）腰髄、（B）頸髄、及び（C）大脳皮質吻側部の SOD1 mRNA 量を有意に減少させた。SOD1 mRNA 量は溶媒対照（PBS）に対する割合（%）を平均値 ± SE で示す（n = 14～18）。ROUT 解析により除外された外れ値は群平均には含めなかった。
統計解析は、一元配置分散分析後に Tukey の多重比較検定を行った。****p < 0.0001
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 2

図 25　トフェルセン IT 又は ICV ボーラス投与 8 週後の腰髄、頸髄、及び大脳皮質吻側部における SOD1 mRNA 量減少作用

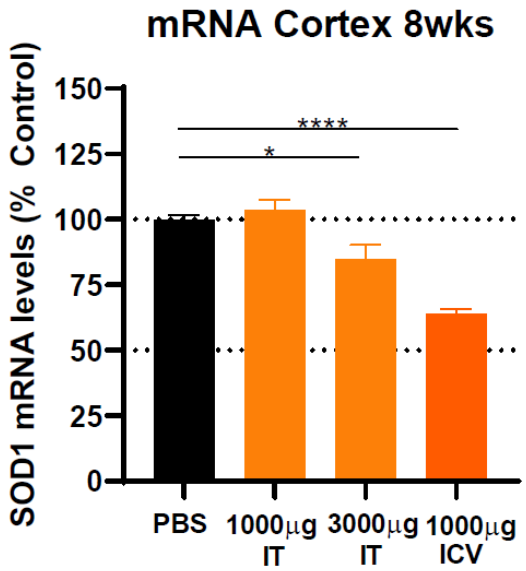
A.



B.



C.



トフェルセンの IT（1000 及び 3000 µg）又は ICV（1000 µg）のボーラス投与は、PBS 投与群と比較し、8 週後では、（A）腰髄、（B）頸髄、及び（C）大脳皮質吻側部の SOD1 mRNA 量を有意に減少した。SOD1 mRNA 量は対照（PBS）に対する割合（%）を平均値 ± SE で示す（n = 14～20）。
PBS 投与群の mRNA 解析は 6 回実施した。データは平均値 ± SE で示す（n = 14~20）。ROUT 解析により除外された外れ値は群平均に含めなかった。
統計解析は、一元配置分散分析後に Tukey の多重比較検定を行った。*p < 0.05、***p < 0.001、****p < 0.0001
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 3

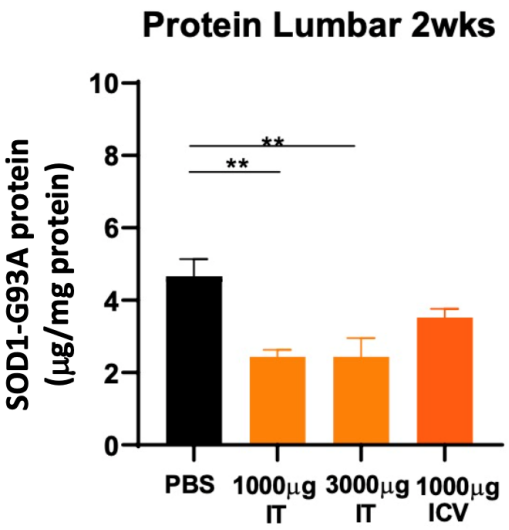
ラット中枢神経系の 3 領域（腰髄、頸髄、及び大脳皮質吻側部）の SOD1-G93A タンパク質濃度を定量した。

トフェルセン投与により 3 領域すべての SOD1 タンパク質濃度が減少した。腰髄では、IT（1000 及び 3000 µg）投与 2 及び 4 週後に SOD1 タンパク質濃度の減少が認められたが、投与 8 週後で

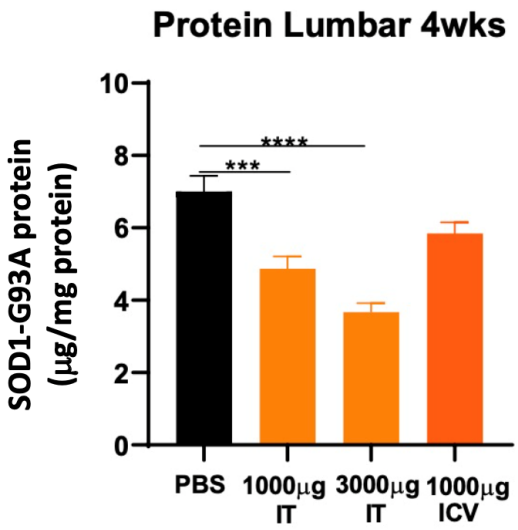
は、高用量のみ SOD1 タンパク質濃度の有意な減少がみられた。ICV（1000 µg）投与では投与後いずれの時点においても SOD1 タンパク質濃度の減少傾向を示したが、有意ではなかった（図 26）。

図 26　　トフェルセン IT 又は ICV ボーラス投与後の腰髄における SOD1 タンパク質濃度

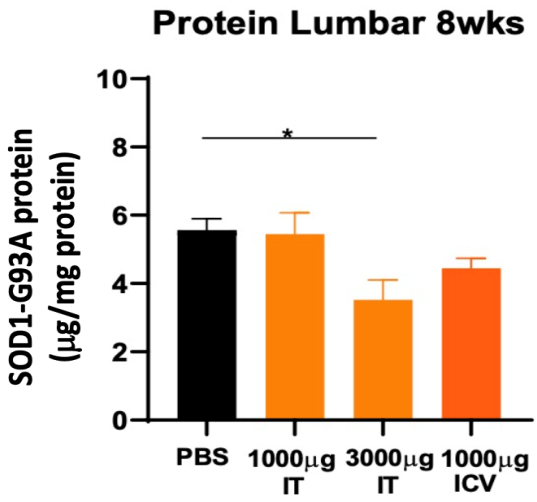
A.



B.



C.

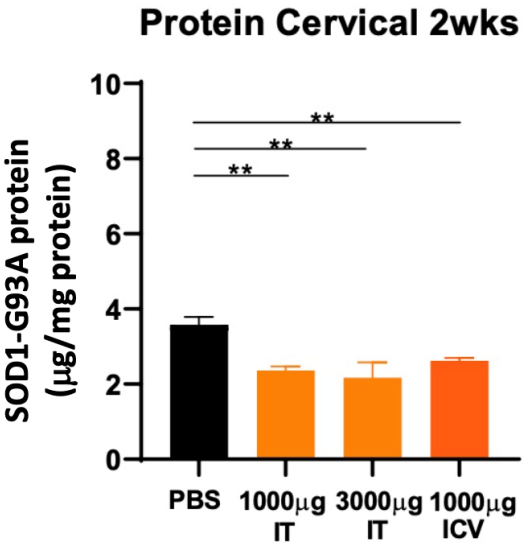


トフェルセンの IT（1000 及び 3000 µg）ボーラス投与は、PBS 投与の SOD1-G93A ラットと比較し、腰髄中の SOD1 タンパク質濃度を有意に減少させた。SOD1 タンパク質濃度は総タンパク質 1 mg 当たりの µg で示す。（A）投与 2 週後（n = 3～5）、（B）投与 4 週後（n = 14～18）、及び（C）投与 8 週後（n = 14～18）。データは平均値 ± SE として示す。ROUT 解析により除外された外れ値は群平均に含めなかった。
統計解析は、一元配置分散分析後に Tukey の多重比較検定を行った。*p < 0.05、**p < 0.01、***p < 0.001、****p < 0.0001
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 4

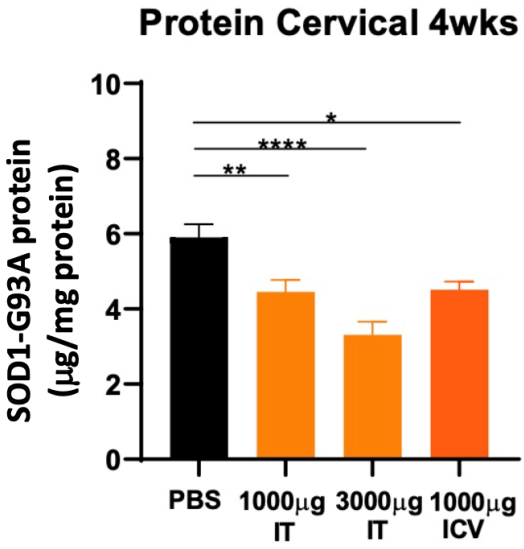
頸髄では、投与用量及び投与経路にかかわらず、すべての時点において SOD1 タンパク質濃度の有意な減少が認められた（図 27）

図 27　　トフェルセン IT 又は ICV 投与 2 週、4 週、及び 8 週後の頸髄における SOD1 タンパク質濃度

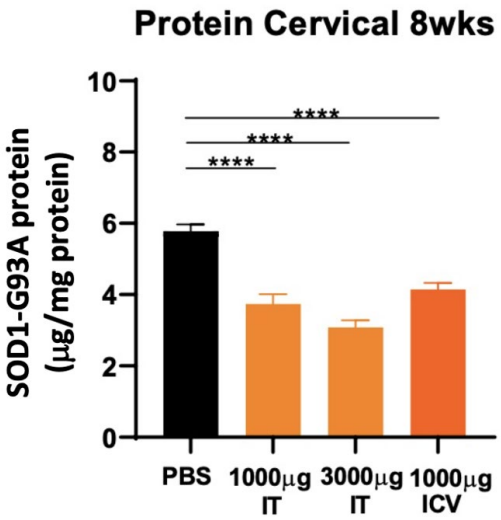
A.



B.



C.

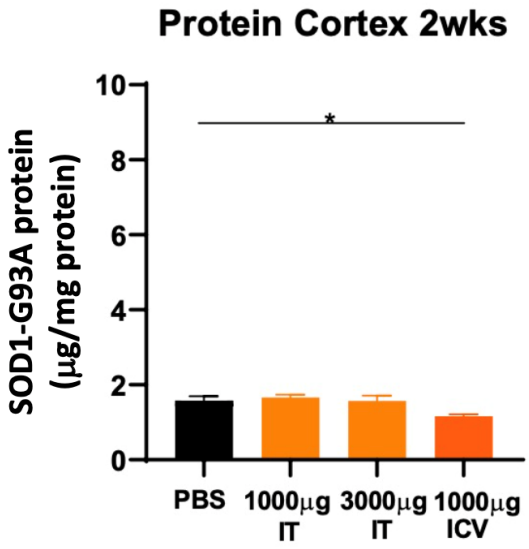


トフェルセンの IT（1000 及び 3000 µg）又は ICV（1000 µg）のボーラス投与は、溶媒対照（PBS）投与の SOD1-G93A ラットと比較し、投与 2、4、及び 8 週後における頸髄の SOD1 タンパク質濃度を有意に低下させた。SOD1 タンパク質濃度は総タンパク質 1 mg 当たりの µg で示す。（A）投与 2 週後（n = 3～5）、（B）投与 4 週後（n = 14～18）、及び（C）投与 8 週後（n = 14～19）。データは平均値 ± SE で示す。ROUT 解析により除外された外れ値は群平均に含めなかった。
統計解析は、一元配置分散分析後に Tukey の多重比較検定を行った。*p < 0.05、**p < 0.01、****p < 0.0001
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 5

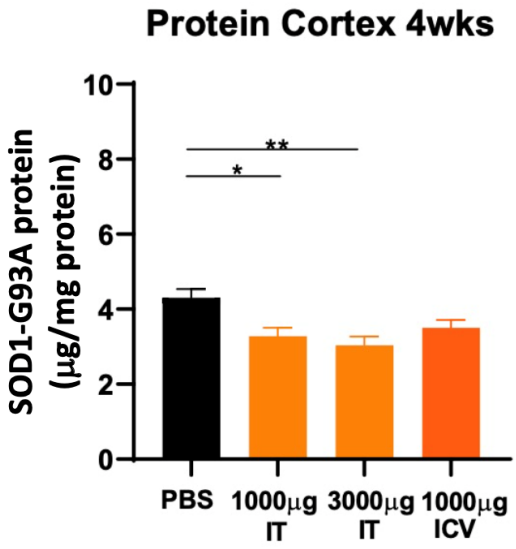
大脳皮質では、投与 2 週後には ICV 投与群のみで SOD1 タンパク質濃度が減少した。投与 4 週間後では IT ボーラス投与したいずれの用量（1000 及び 3000 µg）においても、また、投与 8 週後にはすべての投与用量及び投与経路で SOD1 タンパク質濃度が減少した（図 28）。

図 28　トフェルセン IT 又は ICV 投与 2 週、4 週、及び 8 週後の大脳皮質吻側部における SOD1 タンパク質濃度

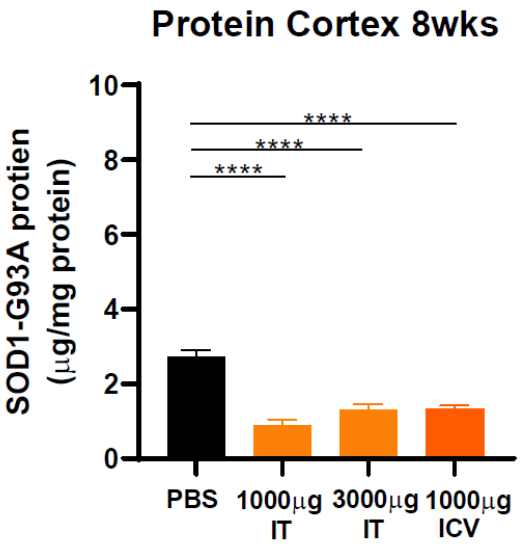
A.



B.



C.



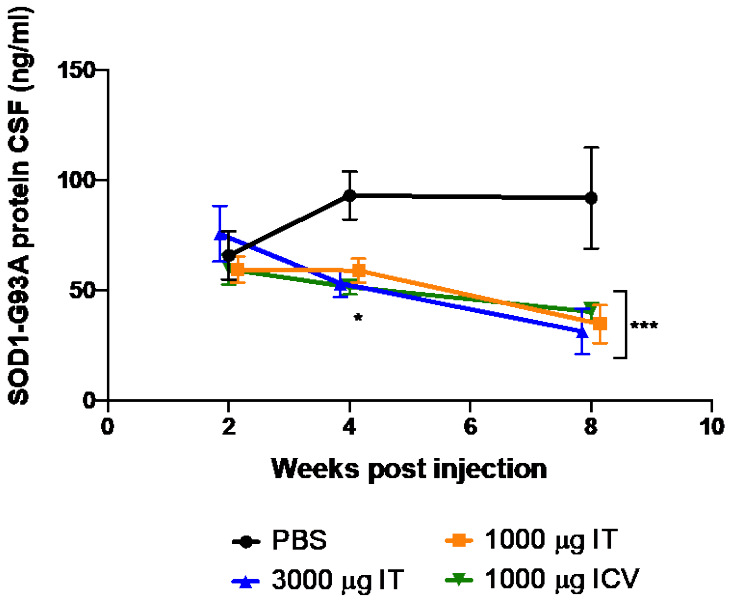
トフェルセンの IT（1000 及び 3000 µg）又は ICV（1000 µg）のボーラス投与は、PBS 投与の SOD1-G93A ラットと比較し、投与 2、4 又は 8 週後の大脳皮質中の SOD1 タンパク質濃度を低下させた。8 週後には、すべての投与群で SOD1 タンパク質の顕著な減少が認められた。SOD1 タンパク質濃度は総タンパク質 1 mg 当たりの µg で示す。(A) 2 週後（n = 3～5）、(B) 4 週後（n = 14～18）、及び (C) 8 週後のデータ（n = 14～19）。データを平均値 ± SE として示す。ROUT 解析により除外された外れ値は群平均に含めなかった。
統計解析は、一元配置分散分析後に Tukey の多重比較検定を行った。*p < 0.05、**p < 0.01、****p < 0.0001
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 6

mRNA 量の減少とタンパク質濃度の減少について、全体的な推移は類似しているものの、いくつかの相違点がみられる。タンパク質濃度の変化は mRNA 量の減少後に起こること、また、SOD1 タンパク質の $t_{1/2}$ は比較的長いことから、タンパク質濃度の減少速度は mRNA 量の減少速度より

も遅いと考えられる。ラットにおいて、SOD1-YFP 融合タンパク質の $t_{1/2}$ は 22 日と算出されているが、SOD1-G85R-YFP タンパク質の $t_{1/2}$ は約 3 日であった［Farr 2011］。トフェルセンは、IT、ICV のいずれの投与においても単回投与後に持続的な SOD1 タンパク質濃度の減少作用を示した。トフェルセンの作用持続時間が長いことは修飾オリゴヌクレオチドの $t_{1/2}$ が長いことと一致している。

CNS 組織におけるトフェルセンの SOD1 抑制作用の間接的な指標としての CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の測定の有用性を評価するため、SOD1-G93A ラットの CSF を採取した。投与 4 及び 8 週後の組織解析に使用した最終時点に加えて、投与 2 週後にも試料を採取した。その結果、投与 4 週後には 1000 µg ICV 投与群で、投与 8 週後には全群で統計学的に有意な SOD1 タンパク質濃度の減少が認められた（図 29）。トフェルセン投与群の 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。本試験では、CSF 中への血液混入によるコンタミネーションの評価は実施していない。赤血球は SOD1 を発現しているため、血液混入により SOD1 タンパク質濃度が偽高値を示す可能性がある［Seehusen 2003］。なお、サル及びヒトの CSF を用いた試験では、血液混入によるコンタミネーションの評価を実施した。

図 29　トフェルセン IT 又は ICV 投与 2 週、4 週、及び 8 週後の CSF 中 SOD1 タンパク質濃度



SOD1-G93A ラットにおいて、トフェルセンの IT（1000 及び 3000 µg）又は ICV（1000 µg）のボーラス投与は、PBS 投与と比較して投与 8 週後の CSF 中 SOD1 タンパク質濃度を低下させた。SOD1 タンパク質濃度は ng/mL で示す。3 回の試験のデータを併合した。mRNA 量の ROUT 解析で除外された外れ値は平均には含めていない。平均値 ± SE を示す（n = 11～41）。データは見やすいようにずらして配置した。
統計解析は、二元配置分散分析後に Dunnett の多重比較検定を行った。PBS 投与群に対する有意差、*$p < 0.05$（投与 4 週後の 1000 µg ICV 投与群）、***$p < 0.001$（投与 8 週後の 1000 µg IT 投与群、3000 µg IT 投与群、及び 1000 µg ICV 投与群）
Data source: M4.2.1.1-10_Figure 7

SOD1-G93A ラットのデータから、トフェルセンは複数の CNS 領域で SOD1 の mRNA 量及びタンパク質濃度を減少させることが示された。さらに、トフェルセン投与の作用が CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の減少としても確認された。

2.11 カニクイザルにおける PK/PD 相関

［4.2.3.2-4］666853-AS01

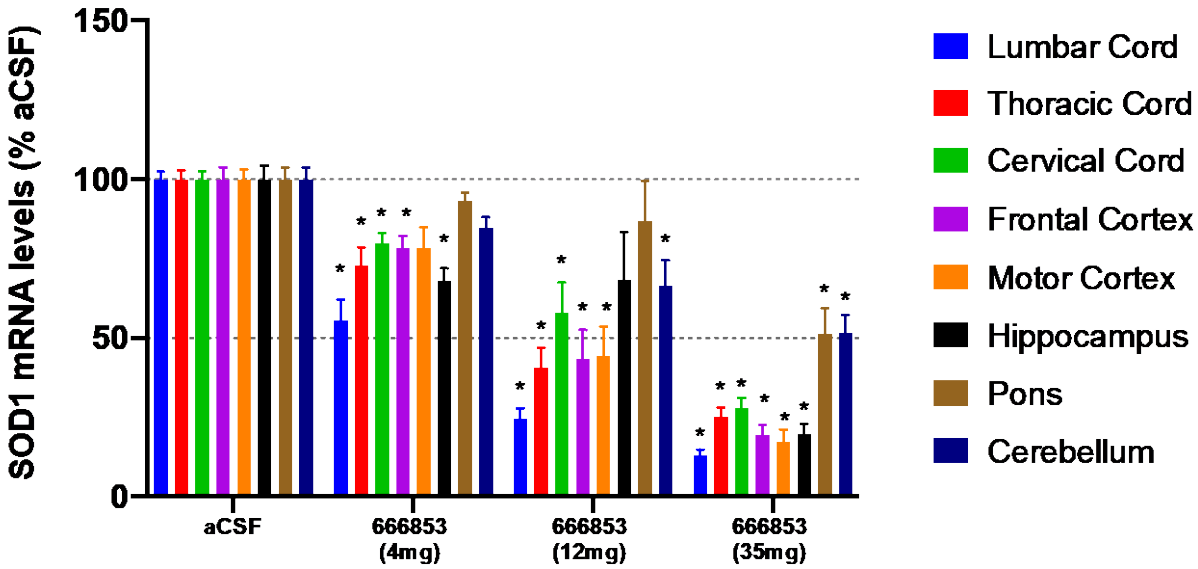
前項に記載したマウス及びラットのデータから、トフェルセンが *in vivo* でヒト SOD1 mRNA 量を減少させる可能性が示されている。げっ歯類を用いた試験の限界の 1 つはヒトと比較して動物のサイズが小さいことであり、CNS の各領域での標的のノックダウンを評価することは困難である。一方、サルは組織分布、細胞への取込み、代謝、及び炎症誘発作用などの ASO のクラス毒性に対する感受性がヒトに最も類似している。さらに、サルの神経解剖学的構造は、他の非臨床試験動物種よりもヒトに近いことから、サルを用いた試験は、CNS の各領域における SOD1 mRNA の相対的なノックダウンを評価し、組織内濃度と CSF 中 SOD1 タンパク質との関係を探索する上で重要である。

カニクイザルを用いたトフェルセンの 13 週間反復 IT 投与毒性及び PK に関する GLP 試験を実施した（666853-AS01 試験）。この GLP 試験の主な目的は、カニクイザルにトフェルセンを 13 週間反復 IT ボーラス投与したときの局所及び全身毒性を評価し、その後の 13 週間の休薬期間での回復性及び遅発発現の可能性を評価することであった。また、PK 及び PD を詳細に検討するため、追加群の動物を複数の時点で評価した。IT 投与経路は、予定臨床投与経路であるため選択した（2.6.6.3.4 項）。

トフェルセンを 0、4、12、及び 35 mg の用量で投与開始 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）の頻度で腰髄 IT ボーラス投与した。また、追加 PK 群には、トフェルセンを 12 mg の用量で同様に 1、14、及び 28 日目に投与した。

その結果、トフェルセンは、脊髄や運動野といった ALS に最も関連した領域を含む CNS 組織全般で、用量依存的に SOD1 mRNA 量を減少させた（図 30）。検討した組織のうち、橋及び小脳での減少の程度は比較的弱く、高用量でのみ有意な減少が認められた。

図 30 トフェルセン投与によるカニクイザルの SOD1 mRNA 量



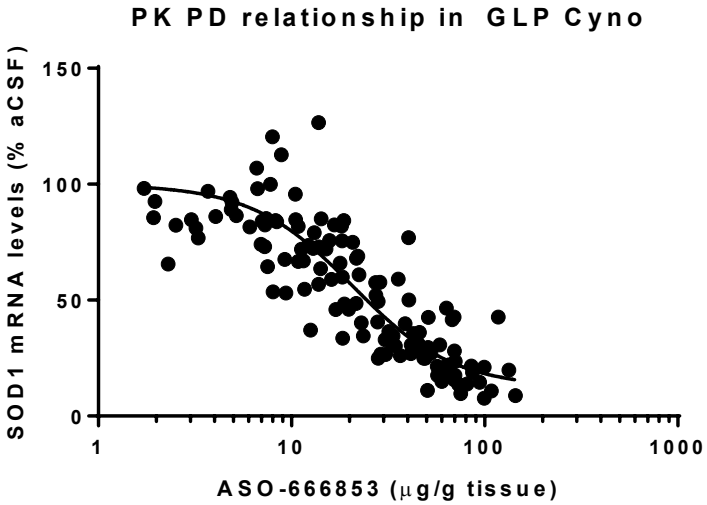
カニクイザルに人工脳脊髄液（aCSF）又は 4、12、及び 35 mg のトフェルセン（666853）を 13 週間で計 5 回 IT

ボーラス投与した。最終投与 1 週後に組織試料を採取し、SOD1 mRNA ノックダウンについて分析した。SOD1 mRNA 量をシクロフィリン RNA で正規化し、aCSF に対する割合として示した。
aCSF 投与群に対する有意差、*p < 0.05（二元配置分散分析後の Dunnett の多重比較検定）。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

カニクイザルの細胞培養系（*in vitro* 試験）においてトフェルセンは、SOD1 に強力な活性を示し（図 4）、*in vivo* での効力は、CNS 各領域での薬物濃度と SOD1 mRNA 量の相関（PK/PD 相関）を調べることで推定可能であった（図 31）。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、前頭皮質、小脳、橋、及び海馬が含まれた。

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。トランスジェニックマウスとサルの間で効力差が生じた原因は不明であるが、差の一部はサルとヒトで SOD1 mRNA 配列の差異（一塩基対ミスマッチ）に起因すると可能性がある。

図 31　　カニクイザル CNS におけるトフェルセンの濃度依存的 SOD1 mRNA 減少作用



カニクイザルに aCSF 又は 4、12、及び 35 mg のトフェルセン（ASO-666853）を 13 週間で計 5 回 IT ボーラス投与した。最終投与 1 週後に組織試料を採取し、組織中オリゴヌクレオチド及び SOD1 mRNA 量を定量した。この図にはすべての用量群における腰髄、胸髄、頚髄、前頭皮質、海馬、小脳、及び橋を合わせてプロットしている。算出された EC_{50} は 20.7 µg/g であり、サルの標的との一塩基対ミスマッチにより影響を受けている可能性がある。
Data source: M4.2.3.2-4 により作成

組織中薬物濃度及び mRNA 量を用いた PK/PD 相関の検討に加えて、サルの試験では、PD マーカーとして CSF 中 SOD1 タンパク質濃度について評価した。その結果、トフェルセンを投与したカニクイザルの CSF では、投与終了時剖検時（91 日目）に、SOD1 タンパク質濃度が投与前値と比較して約 45%減少した。概して減少の程度には用量依存的に大きくなる傾向がみられ、SOD1 濃度測定値を増加させる明らかなヘモグロビン混入［Seehusen 2003］が認められる試料を解析から除外すると、この減少はより顕著であった。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性試験のサルでも引き続き認められた（175 日目）。一方、トフェルセンを投与しなかったサルの CSF では、試験中（91 及び 175 日目）に SOD1 がわずかに増加した。

これらの結果より、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。

以上の非臨床薬理試験成績から、トフェルセンはヒト SOD1 を強力に抑制することが示唆された。本薬は培養細胞及び種々の *in vivo* モデルで活性を示した。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において、ヒトで到達可能と考えられる濃度で SOD1 濃度を減少させた。さらに、トフェルセンとサル SOD1 mRNA との塩基配列の比較で一塩基対ミスマッチがみられたが、トフェルセンはサルにおいても活性を示した。トフェルセンの標的部位は SOD1 遺伝子の 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 変異を有する ALS 患者に対して広範に使用できる可能性がある。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。

3 副次的薬理試験

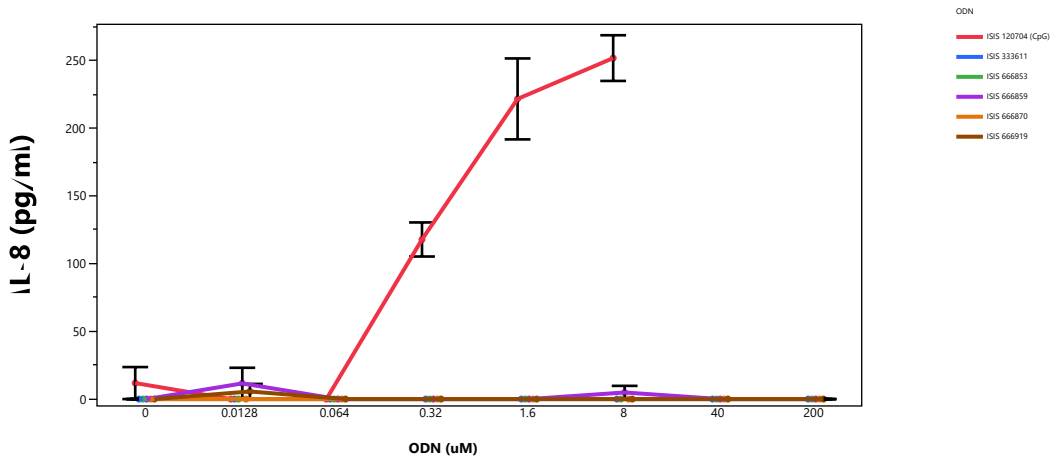
トフェルセンの副次的薬理試験を *in vitro* 及び *in silico* で実施した。Toll 様受容体 9（TLR9）を過剰発現している HEK293XL 細胞を用いて、トフェルセン処理によりケモカイン産生が刺激されるかどうかを検討した。また、トフェルセンのオフターゲット作用を初回 IND 申請前（EXP-[redacted]-AA0331）と本申請前（EXP-OT-[redacted]20[redacted]）に評価した。2 回目の解析では、最新のトランスクリプトームアノテーション及び ASO の作用プロファイルに関する最近の文献を包括的に反映させるために実施した。

3.1 ヒト TLR9 を過剰発現させた HEK293XL 細胞における SOD1 ASOs の作用とヒトケモカインの解析

［4.2.1.2-1］SOD1-HEKhTLR9-1

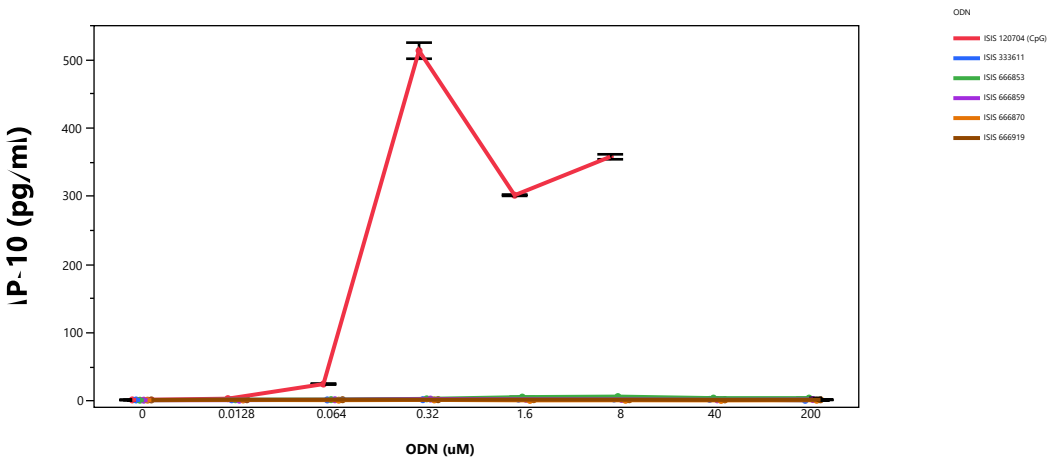
本試験の目的は、SOD1 ASOs の一定の濃度範囲で処理後の HEK293XL-hTLR9a 細胞培養上清中のインターロイキン 8（IL-8）及びインターフェロン誘導タンパク質 10（IP-10）を測定することであった。ISIS 333611、トフェルセン（ISIS 666853）、ISIS 666859、ISIS 666870、ISIS 666919、及び ISIS 120704 によるケモカイン誘導作用を図 32 及び図 33 に示した。TLR 9 を活性化する陽性対照オリゴヌクレオチド ISIS 120704 処理による IL-8 産生は 251.7 pg/mL（ASO 濃度 8 µM）であるのに対して、未処理細胞では IL-8 は検出されなかった（図 32、表 2）。一方、SOD1 ASOs は 200 µM までの濃度で検出可能な濃度の IL-8 産生はみられなかった。ISIS 120704 は、未処理細胞の 1.8 pg/mL に対して、513.4 pg/mL（ASO 濃度 0.32 µM）まで IP-10 産生を増加させた（図 33、表 2）。いくつかの SOD1 ASOs（ISIS 333611、ISIS 666859、及びトフェルセン）処理により、未処理細胞（1.8 pg/mL）と比較し、IP-10 産生は非常にわずかではあるが有意な増加がみられ、最大反応はトフェルセン処理でみられた（8 µM で 6.9 pg/mL）。

図 32 HEK293XL-hTLR9a 細胞における ISIS 120704 及び SOD1 ASOs の IL-8 誘導作用の比較



HEK293XL-hTLR9a 細胞をトフェルセン（ISIS 666853）、その他の SOD1 ASOs（ISIS 333611、ISIS 666859、ISIS 666870、及び ISIS 666919）、及び陽性対照の TLR9 活性化オリゴヌクレオチド（ISIS 120704）とともに 24 時間インキュベートした後、細胞培養上清中 IL-8 を Multiplex MSD アッセイで測定した。試験実施中に得られた数値データから平均値 ± SD を算出した（n = 3）。
Data source: M4.2.1.2-1_Figure 1

図 33　　HEK293XL-hTLR9a 細胞における ISIS 120704 及び SOD1 ASOs の IP-10 誘導作用の比較



HEK293XL-hTLR9a 細胞をトフェルセン（ISIS 666853）、その他の SOD1 ASOs（ISIS 333611、ISIS 666859、ISIS 666870、及び ISIS 666919）、及び陽性対照の TLR9 活性化オリゴヌクレオチド（ISIS 120704）とともに 24 時間インキュベートした後、細胞培養上清中 IP-10 を MSD アッセイで測定した。試験実施中に得られた値より平均値 ± SD を算出した（n = 3）。
Data source: M4.2.1.2-1_Figure 2

表 2　　サイトカイン誘導作用のまとめ（最大作用及び濃度）

処理	IL-8		IP-10	
	濃度 (pg/ml)	最大作用 (μM)	濃度 (pg/ml)	最大作用 (μM)
ISIS 333611	0	n/a	3.3*	8
トフェルセン	0	n/a	6.9*	8
ISIS 666859	0**	n/a**	3.2*	0.32
ISIS 666870	0	n/a	2.0	0.32
ISIS 666919	0	n/a	2.4	1.6
ISIS 120704	251.7*	8	513.4*	0.32

一元配置分散分析後、Dunnett の多重比較検定（すべての未処理細胞と比較）を実施し、各 ODN の最大効果値におけるサイトカイン濃度の有意性を評価した。
n/a：該当せず。*p < 0.05; **繰り返し 3 回中 1 回で LLOD を上回り、平均値が LLOD を下回った。
Data source: M4.2.1.2-1 Table 1

要約すると、トフェルセンの処理により、わずかではあるが有意な IP-10 の増加が認められた（未処理細胞の 1.8 pg/mL に対して 6.9 pg/mL）。この程度の増加により生物学的作用が引き起こされるとは考えられない。対照的に陽性対照 ASO の処理により IP-10 の誘導が認められた（513.4 pg/mL）。検討した SOD1 ASOs のいずれにおいても、IL-8 の増加は認められなかった。

3.2 トフェルセンのオフターゲット遺伝子解析

［4.2.1.2-2］EXP-[redacted]-AA0331、［4.3-14］Cioffi 1997、［4.3-61］Vickers 2003、

［4.3-72］Zhang 2000、［4.3-41］Langmead 2009

ASO の特異性はその一次配列により決定づけられる。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において3つ以上のミスマッチ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［Cioffi 1997、Vickers 2003、Zhang 2000］。ヒトゲノム参照配列（GRCh37/hg19）及び Bowtie アルゴリズム［Langmead 2009］を用いてヒトトランスクリプトームのコンピューター解析を実施した。トフェルセンと 17 の連続した相補的塩基対を生じる配列又は全配列と比較して 0、1、又は 2 つのミスマッチを有する配列をすべて特定し、オフターゲット結合の可能性を検討した。

1 つ以下のミスマッチを有する遺伝子は認められなかった。2 つのミスマッチを有する遺伝子は以下の 4 つであった：RBFOX2（RNA binding protein, fox-1 homolog [*Caenorhabditis elegans*] 2）、SLC30A9（solute carrier family 30 [zinc transporter], member 9）、KCTD16（potassium channel tetramerization domain containing 16）、及び LINC00669（long intergenic non-protein coding RNA 669）。トフェルセンと、ミスマッチを有する遺伝子（トランスクリプト）を比較したアラインメントを図 34 に示す。

図 34　　トフェルセンと 2 つのミスマッチを示した遺伝子とのアラインメント

a) RBFOX2

```
666853:  3′-TCGACATCTTTACATAGGAC-5′
                |||| |||||||||| ||||
RBFOX2: GGGAAGCUUUAGAAAUGUAACCUGGAA
```

b) SLC30A9

```
666853:  3′-TCGACATCTTTACATAGGAC-5′
                |||||  |||||||||||| |
SLC30A9: AAGCAGCUGAAGAAAUGUAUCCAGGAC
```

c) KCTD16

```
666853:  3′-TCGACATCTTTACATAGGAC-5′
                |||||  |||||||||||| |
KCTD16: GAGGAGCUGGAGAAAUGUAUCCAGGAU
```

d) LINC00669

```
666853:  3′-TCGACATCTTTACATAGGAC-5′
                |||||||||| |||||  ||
LINC00669: CAGCAGCUGUAGAAAGGUAUCUUGGGA
```

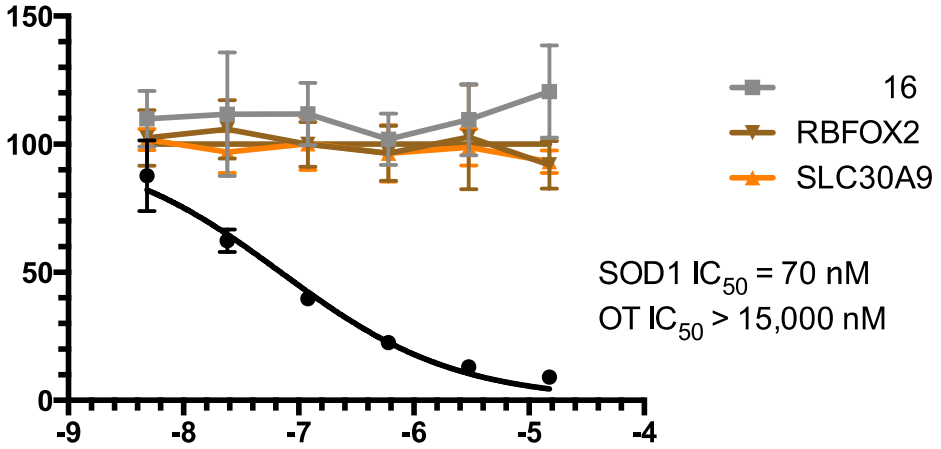
ヒトトランスクリプトームから、トフェルセン（図中では 666853）と相補性を有するトランスクリプトをスクリーニングした。それぞれ 2 つのミスマッチを有するトランスクリプトが 4 つ特定された。そのうち 3 つ（RBFOX2、SLC30A9、及び KCTD16）については、相補性を示した配列のコード領域が判明している：a）RBFOX2、イントロン 2；b）SLC30A9、イントロン 6；c）KCTD16、3'-UTR；d）LINC00669
Data source: M4.2.1.2-2_Figure 1

これらのオフターゲット候補遺伝子のうち、LINC00669 の機能は不明であり、薬理作用を示す ASO 濃度に達すると予想される唯一の組織である CNS には発現していないと考えられる。薬理作用発現濃度より低い濃度の ASO が蓄積すると考えられる肝臓及び腎臓といった臓器でも LINC00669 は認められていなかった。したがって、この遺伝子について追加の実験は実施しなかった。その他の 3 つのオフターゲット候補遺伝子（RBFOX2、SLC30A9、及び KCTD16）は CNS において様々なレベルで発現しており、機能的意義を有する可能性があることから、トフェルセンの転写抑制作用を培養細胞実験で検討した。

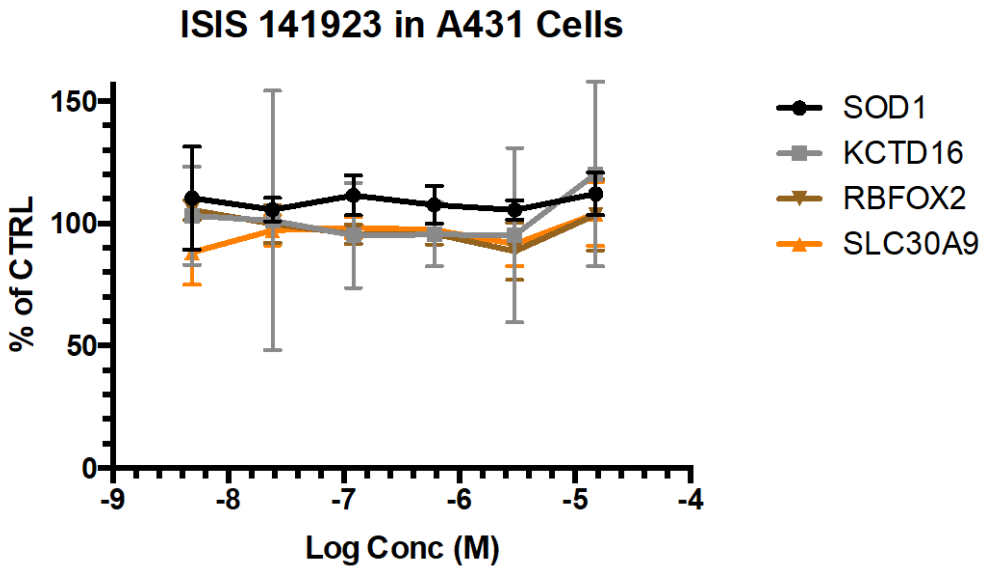
A431 及び SH-SY5Y 細胞を陰性対照 ASO（ISIS 141923）又はトフェルセンのいずれかで処理した 24 又は 48 時間後に、SOD1 及び 3 つのオフターゲット候補遺伝子の転写量を qRT-PCR 法で定量した。その結果、A431 細胞では、いずれのオフターゲット候補遺伝子の発現にも 15 μM までのトフェルセン添加により発現への影響は認められなかった（図 35）。一方、SOD1 mRNA 量は著明に減少し、その作用の EC_{50} は 70 nM であったことから、トフェルセンは他のミスマッチ遺伝子と比較して SOD1 に 200 倍を超える選択性を示した。

図 35　　A431 細胞におけるトフェルセンの SOD1 選択的 mRNA 減少作用

A)



B)

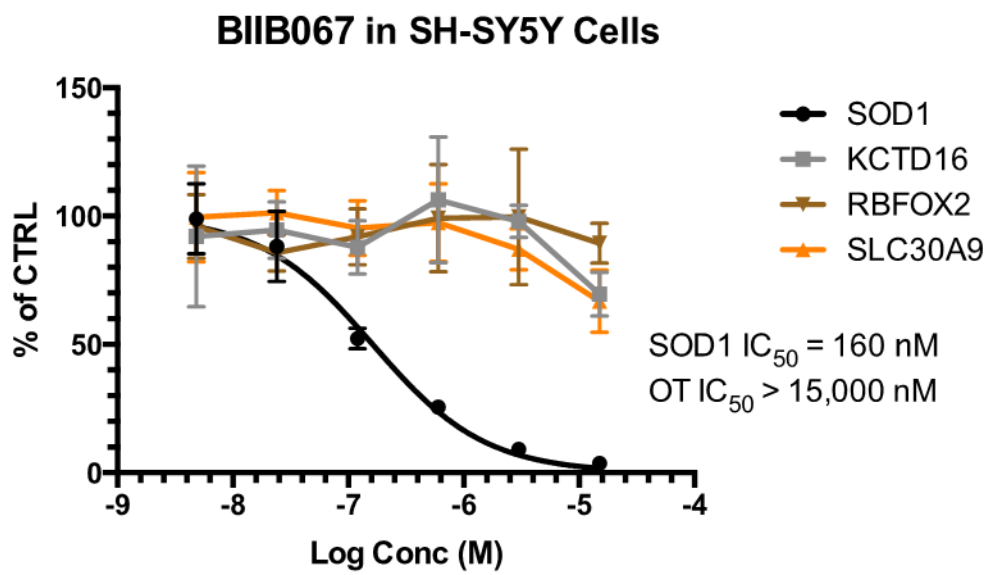


A431 細胞を 15 µM までの漸増濃度の（A）トフェルセン（ISIS 666853）又は（B）陰性対照 ASO の ISIS 141923 で処理し、48 時間後に SOD1、KCTD16、RBFOX2、及び SLC30A9 の mRNA 量を定量した。トフェルセン処理により、SOD1 mRNA 量のみが濃度依存的に減少し、その作用の IC_{50} は 70 nM であった。ISIS 141923 はオフターゲット候補遺伝子の mRNA 量をいずれも変化させなかった（一元配置分散分析後の Dunnett の多重比較検定で有意ではなかった）。値は 4 回の実験の平均値 ± SD で示す。
Data source: M4.2.1.2-2_Figure 2

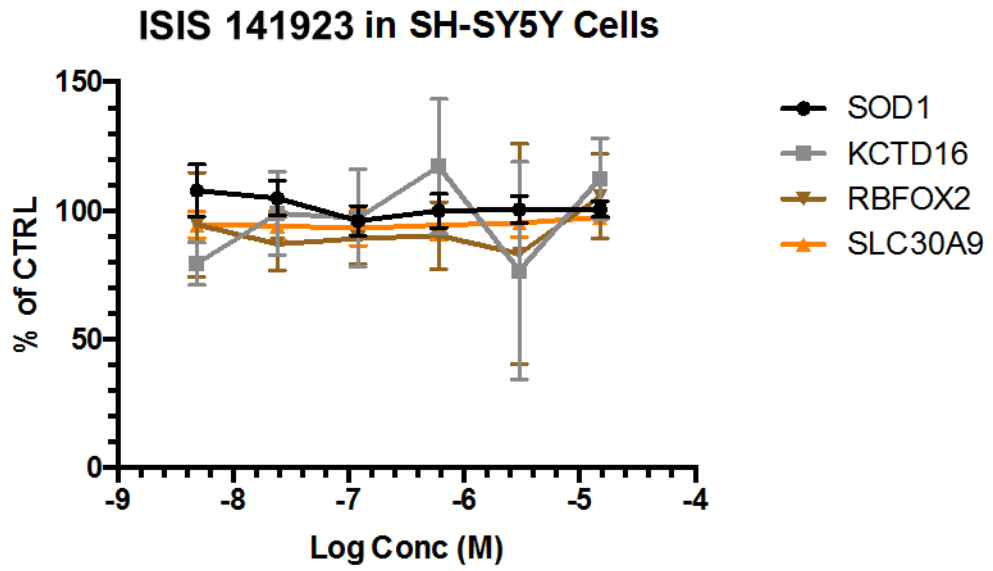
SH-SY5Y 細胞では、SLC30A9 及び KCTD16 mRNA 量が最高濃度（15 µM）で約 30%減少した（図 36）。本試験におけるトフェルセンの SOD1 mRNA 量減少作用の EC_{50} は 160 nM であったことから、トフェルセンはオフターゲット候補遺伝子と比較して、SOD1 mRNA に 90 倍を超える選択性を示した。

図 36　　SH-SY5Y 細胞におけるトフェルセンの SOD1 選択的 mRNA 減少作用

A)



B)



SH-SY5Y 細胞に 15 µM までの濃度の（A）トフェルセン又は（B）陰性対照の ISIS 141923 をエレクトロポレーション法により処理したところ、SOD1 mRNA 量は強力に減少したが、特定されたミスマッチオフターゲット遺伝子である KCTD16 及び RBFOX2 は減少しなかった。SLC30A9 は最高濃度で 33%減少し（$p < 0.0001$、一元配置分散分析後の Dunnett の多重比較検定）、IC_{50} は 15 µM 超であった。値は 4 回の実験の平均値 ± SD で示す。
Data source: M4.2.1.2-2_Figure 3

ヒトトランスクリプトームのコンピューター解析において、2 つのミスマッチ塩基対を持つ 4 つのオフターゲット候補遺伝子のみが同定された。4 つのオフターゲット候補遺伝子のうち 3 つで、ミスマッチ塩基対によりトフェルセンの活性が著しく減少することが A431 及び SH-SY5Y 細胞で示された。4 つ目の遺伝子は CNS、肝臓及び腎臓に発現していないと考えられ、その遺伝子に起因する機能も認められていないことから、検討は行わなかった。

3.3 トフェルセンのオフターゲット遺伝子追加解析

［4.2.1.2-3］EXP-OT-[redacted]20[redacted]、［4.3-67］Yoshida 2019、［4.3-38］Kotzin 2016

本試験の目的は、初回 IND 申請前の検討から更新されたヒトゲノム及び RefSeq アノテーション（GRCh38/hg38）を参照して、トフェルセンの *in silico* 及び *in vitro* の特異性を明らかにすることであった（EXP-[redacted]-AA0331）。オフターゲット予測に関する最近の研究によると、ASO は核酸アラインメント解析におけるミスマッチに加えて、挿入及び／又は欠失がみられる標的に対しても活性を示す可能性があり、その活性は標的配列に非相補的な塩基が 3 つ以上ある場合に有意に低下することが示されている［Yoshida 2019］。具体的には、Bowtie アルゴリズムを用いたトフェルセンの *in silico* オフターゲット解析により、核酸アラインメントにおいて多数の連続した相補的塩基対を生じる RNA 配列並びにミスマッチ又は挿入／欠失により生じる非相補的塩基対が 2 つまでの RNA 配列を特定した。Bowtie を用いて挿入／欠失を導入した配列を検索できるよう、トフェルセンの一次配列を修正し、アラインメント前にすべての内部位置の挿入／欠失を導入した。選択された特定の RNA に対するトフェルセンの作用を、培養細胞実験で評価し、遺伝子発現に対する作用の効力をオンターゲットである SOD1 mRNA 量減少作用の効力と比較した。

その結果、トフェルセンが完全な相補性を示すのは SOD1 mRNA のみであった。さらに、トフェルセンは、初回 IND 申請時にすでに特定されていた 4 つの遺伝子とも 2 つのミスマッチを示した：1）RBFOX2（RNA binding protein, fox-1 homolog [*Caenorhabditis elegans*] 2）、2）SLC30A9（solute carrier family 30 [zinc transporter], member 9）、3）KCTD16（potassium channel tetramerization domain containing 16）、及び 4）LINC00669/MIR924HG（long intergenic non-protein coding RNA 669/MIR924 Host Gene）。より最近のトランスクリプトームデータベースを補完的に使用することにより、2 つのミスマッチを有する長鎖ノンコーディング RNA（lncRNA）配列 LOC107986330 がさらに特定された。そのほかに、ミスマッチ及び ASO／RNA バルジ（挿入／欠失）を計 2 つ有する 22 の RNA が特定された（表 3）。

表 3　オフターゲット候補遺伝子の *in silico* 予測

遺伝子名	鎖	chr	開始座標	不対合様式とその数
ADIPOR1	+	chr1	202955054	ASO バルジ：2
BCAP29	-	chr7	107599908	ASO バルジ：1、mm：1
CDC123	-	chr10	12230688	ASO バルジ：1、mm：1
CDYL2	+	chr16	80732239	ASO バルジ：1、mm：1
CLPTM1L	+	chr5	1328293	RNA バルジ：1、mm：1
COL28A1	+	chr7	7496937	ASO バルジ：2
CREB1	-	chr2	207599592	ASO バルジ：1、mm：1
CSNK2A2	+	chr16	58190301	ASO バルジ：1、mm：1
DCLRE1A	+	chr10	113837654	ASO バルジ：1、RNA バルジ：1
KCNH8	-	chr3	19480009	ASO バルジ：1、RNA バルジ：1
KCTD16	-	chr5	144474007	2 mm
KLF12	+	chr13	73931366	ASO バルジ：1、mm：1
LINC01924	-	chr18	64143136	ASO バルジ：1、mm：1

遺伝子名	鎖	chr	開始座標	不対合様式とその数
LMBR1	+	chr7	156813603	ASO バルジ：1、mm：1
LOC101927066	+	chr8	97105860	ASO バルジ：1、mm：1
LOC105370805	-	chr15	47976718; 47976719	ASO バルジ：1、mm：1 ; ASO バルジ：2
LOC107986330	-	chr4	184035879	2 mm
MIR4435-2HG	+	chr2	111355052	ASO バルジ：1、mm：1
MIR924HG	+	chr18	39251976	2 mm
NDST4	+	chr4	115027127	RNA バルジ：1、mm：1
POU6F2	-	chr7	39359993	RNA バルジ：1、mm：1
RBFOX2	+	chr22	35875436	2 mm
RPS6KA2	+	chr6	166474685	ASO バルジ：2
SGSM2	-	chr17	2360490	ASO バルジ：1、mm：1
SLC30A9	-	chr4	42027867	2 mm
SND1	-	chr7	127912450	RNA バルジ：1、mm：1
USP33	+	chr1	77741113	ASO バルジ：1、mm：1

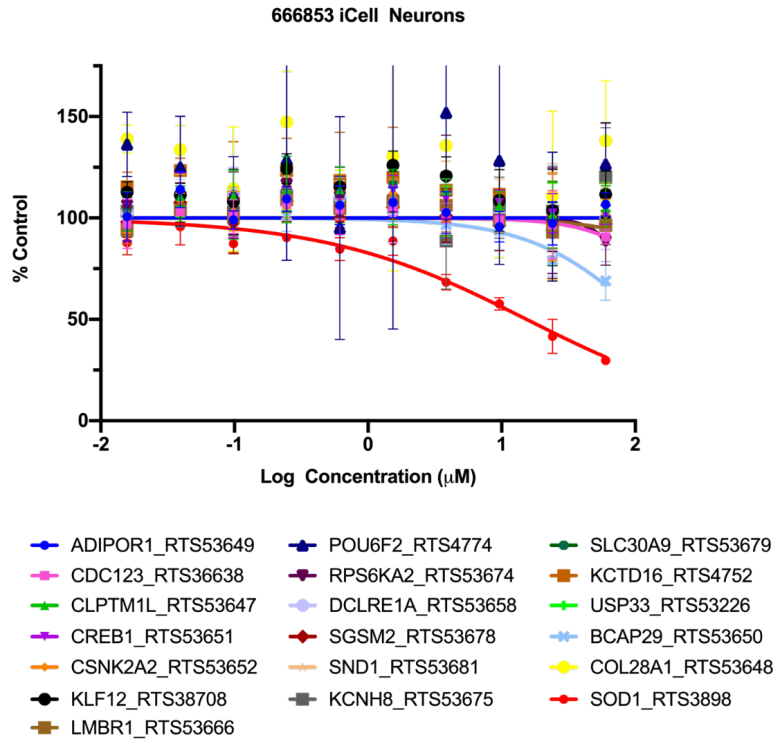
chr：染色体、mm：ミスマッチ、ASO バルジ：ASO 配列における挿入と同義、RNA バルジ：ASO 配列における欠失と同義。鎖は対合する鎖（ASO が対合する当該重複遺伝子の鎖）を表す。開始座標は当該重複遺伝子と対合する際のゲノム上の開始位置を表す。不対合様式には、予測されるオフターゲット RNA とトフェルセンとの対合で生じるミスマッチ（mm）、ASO バルジ、及び／又は RNA バルジの数を示した。
Data source: M4.2.1.2-3_Table 1

なお、LINC01924、LOC101927066、LOC105370805、LOC107986330、MIR924HG、及び NDST4 は CNS で発現しておらず、これらの遺伝子は、NCBI Gene 及び／又は Online Mendelian Inheritance in Man（OMIM）データベース検索によっても、疾患あるいは生理学的変化との関連を示す報告はみられなかった。そのため、これらの遺伝子のさらなる *in vitro* 評価は行わなかった。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、MIR4435-2HG は CNS には発現しておらず、一部の末梢組織では弱い発現がみられたのみであった。

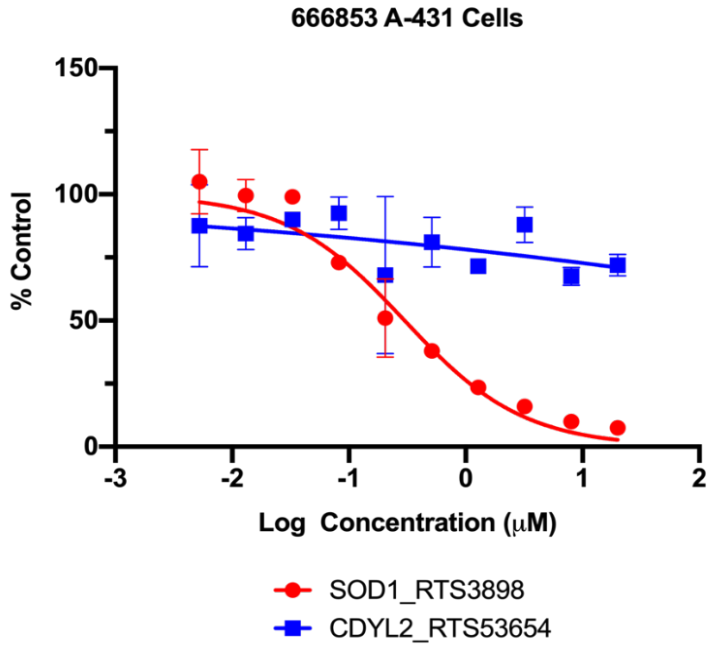
残り 20 のオフターゲット候補遺伝子のうち 19 個について、発現プロファイルに応じ、iCell 神経細胞又は A431 細胞を用いて *in vitro* 評価を実施した（図 37）。オフターゲット遺伝子解析報告書（EXP-[redacted]-AA0331）において、RBFOX2 はオフターゲット評価においてリスクが低かったことから、本実験では再評価を行わなかった。SOD1 mRNA に対するトフェルセンの IC_{50} は、iCell 神経細胞及び A431 細胞でそれぞれ 15.3 µM（最大減少は 70.3%）及び 0.3 µM（最大減少 92.5%）であった。

図 37　　ヒト培養細胞におけるトフェルセンのオフターゲット候補遺伝子の発現に及ぼす影響

A.　　iCell neurons



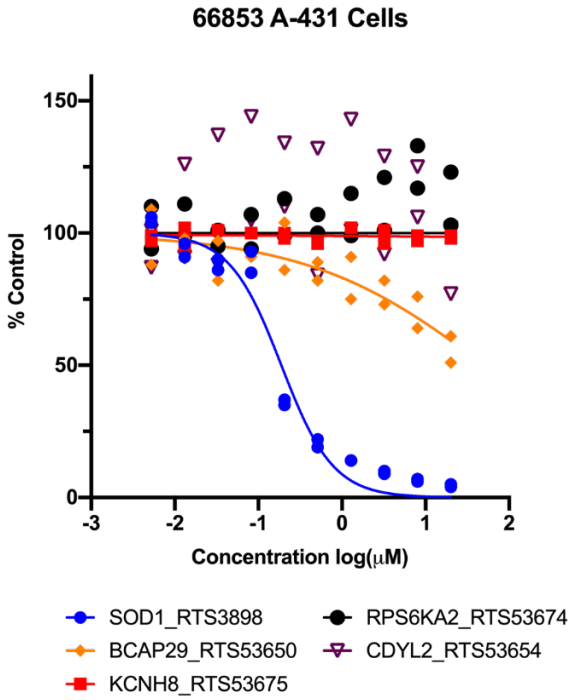
B. A431 cells



オフターゲット候補遺伝子の発現プロファイルに応じて、（A）ヒト iCell 神経細胞及び（B）A431 細胞の 2 種類の細胞を用いて free-uptake 法によりトフェルセン（66853）の特異性を評価した。トフェルセン処理による SOD1 の IC_{50} は、iCell 神経細胞及び A431 細胞でそれぞれ 15.3 μM 及び 0.3 μM であった。オフターゲット RNAs は試験した最高濃度（60 μM iCell Neuron, 20 μM A431 cells）で 50%以上低下しなかった。4 種類の遺伝子は、これら細胞系で 10%以上の最大低下に達した（BCAP29 31%、KCNH8 11%、RPS6KA2 11%、CDYL2 32.5%）。
内部標準として GAPDH を用い、対照として溶媒投与群を設けた。値は溶媒投与群の値を 100 としたときの割合（%）（平均値 ± SD）で示す。
Data source: M4.2.1.2-3_Figure 1

4 つの RNA（BCAP29、KCNH8、RPS6KA2、及び CDYL2）は、各細胞系で試験した最高用量で 10%を超える最大減少を示した。これらの RNA に対する影響について A431 細胞でさらに検討した。この系では、トフェルセンは SOD1 mRNA に対して高い効力を示した（図 38）。トフェルセンの SOD1 mRNA に対する IC_{50} は 0.2 µM であったが、これらの 4 つの遺伝子については、検討した最高濃度（20 µM）のトフェルセン処理によっても 50%を超える減少（発現量の 50%を超える減少）はみられず、IC_{50} は得られなかった。したがって、トフェルセンは、評価した 19 のオフターゲット候補 RNA との比較で、オンターゲットの SOD1 mRNA に対して 100 倍以上強い作用を示すことが明らかになった。

図 38　A431 細胞における BCAP29、KCNH8、RPS6KA2、及び CDYL2 の発現に及ぼすトフェルセンの影響



10%以上の減少を示したオフターゲット遺伝子を A431 細胞で再評価した。トフェルセンの SOD1 に対する減少作用の IC_{50} は 0.2 µM であった。オフターゲット候補 RNA については、検討した最高濃度（20 µM）でも 50%以上の減少は認められなかった。結果は GAPDH 及び UTC に対する割合を示す。
Data source: M4.2.1.2-3_Figure 2

以上、トフェルセンと完全な相補性を示したのは SOD1 mRNA のみであった。さらに 27 の遺伝子がオフターゲットと予測され、いずれも SOD1 標的配列と非相補的な塩基を 2 つ有していた（表 3）。*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。ASO のオフターゲット遺伝子の予測において、2 つまでのミスマッチ、挿入、及び／又は欠失という基準を設けた場合、予測されるオフターゲット遺伝子の数は通常、限られた数となる。4 つのオフターゲット遺伝子発現に対してトフェルセンは弱い *in vitro* 活性を示したが、過去の ASO 開発経験に基づくと、トフェルセンは *in vivo* での作用を生じることは考えられない。

4 安全性薬理試験

安全性薬理パラメータのモニタリングとして、*in vitro* の h*ERG* カリウムチャネル阻害試験（P067-19-04）、*in vivo* のラット単回投与毒性試験（666853-AS03）、カニクイザル 13 週間（666853-AS01）、及び 9 ヵ月間（P067-[redacted]-01）反復投与毒性試験を実施した。動物の組織及び CSF 中の SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度をカニクイザル 13 週間試験（666853-AS01）でモニタリングした。これらの試験の詳細は、M2.6.6 に記載する。

4.1 ヒト胎児由来腎細胞に発現させたクローン h*ERG* カリウムチャネルに対するトフェルセンの影響

［4.2.1.3-1］P067-19-04

この GLP 適用試験の目的は、生理的温度に近い温度での h*ERG* チャネル電流（急速活性化遅延整流心臓カリウム電流［I_{Kr}］）に対するトフェルセンの影響を *in vitro* で検討することであった。

均質性を検討するための試料を薬液保存容器から採取した。試料分析結果から、試験開始時にすべての薬液が均質であることが示された。灌流装置の流出液から被験物質溶液試料を採取し、分析して濃度を確認した。試料分析の結果から、いずれの試験濃度でも、トフェルセンの測定濃度は名目濃度の±15.0%以内であり、判定基準を満たした。

トフェルセンによる h*ERG* 電流阻害率（平均値 ± SE、n = 4）は、1 μM で 9.3 ± 1.3%、3 μM で 14.0 ± 2.8%、10 μM で 6.1 ± 1.8%、34 μM で 9.1 ± 4.0%で、溶媒対照群（阻害率 : 15.8 ± 1.7%、n = 4）と比較し、統計学的な有意差（$p < 0.05$）は認められなかった。最高濃度の 34 μM においても阻害率は 50%を超えなかったことから、トフェルセンの h*ERG* カリウム電流阻害作用の IC_{50} は 34 μM よりも高いと推定された。34 μM は臨床用量である 100 mg 投与時の血漿中最高濃度（C_{max}）の 100 倍の濃度である。

なお、陽性対照のテルフェナジン（60 nM）により h*ERG* カリウム電流が阻害（76.1 ± 5.2% : 平均値 ± SD、n = 2）され、試験系の感度が確認されている。ベラパミルによる h*ERG* カリウム電流阻害率（平均値 ± SE、n = 4）は、0.03 μM で 10.5 ± 1.5%、0.1 μM で 25.5 ± 0.9%、0.3 μM で 40.8 ± 1.8%、及び 1 μM で 79.1 ± 1.3%であった。ベラパミルの h*ERG* カリウム電流阻害作用の IC_{50} は 0.3 μM（Hill 係数 = 1.0）であった。

4.2 カニクイザルの中枢神経系、呼吸系、及び心血管系に対するトフェルセンの影響

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

サルの反復 IT ボーラス投与試験で、CNS 機能については、Primary Observation Test 変法（体温を含む）［Irwin 1968］を用いて、一般感覚運動、脳反射（瞳孔、眼輪筋及び角膜）、脊髄反射（肛門、膝蓋腱、及び足の把握）、及び標準的な神経行動検査項目を評価した。また、呼吸機能については、血液ガスパラメータを評価した。心血管系機能については、無麻酔で一時的に保定した動物で心電図（ECG）及び血圧を測定した。

トフェルセンの初回又は反復 IT 投与後に心血管系、呼吸、及び体温への影響は認められなかった。35 mg/回の用量でサルに 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 時間後までに回復した（詳細は M2.6.6 参照）。13 週間及び 9 ヵ月間毒性試験における一般的な神経学的検査（一般感覚、運動機能、及び脳反射）の結果は、9 ヵ月間毒性試験における 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。

4.3 ラットの中枢神経系及び呼吸系に対するトフェルセンの影響

［4.2.3.1-1］666853-AS03

ラットの単回ボーラス投与毒性試験では、CNS 及び呼吸機能も評価した。CNS 機能は、機能観察総合評価法（FOB）で評価した。呼吸機能は、一般状態観察及び FOB で評価した。3 mg 群の雄 1 例が投与約 45 分後に死亡した。トフェルセンの予想される作用機序を踏まえると、本所見は ASO としての生理化学的特性及び投与液濃度に関連していた可能性が最も高い。また、トフェルセン 3 mg を投与した 20 例中 4 例で、投与終了から約 25 分以内に一過性の急性触覚過敏が認められた。投与 3 時間後の FOB では、3 mg 群で覚醒、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変化は認められなかったため、一過性の変化と判断した。

5　　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

6 考察及び結論

トフェルセンはヒト SOD1 抑制を指標とする ASO スクリーニングから選択された。トフェルセンは SOD1 mRNA を標的とするため、SOD1 mRNA の変異型及び野生型の両対立遺伝 3'-UTR 子を抑制する。広範なシーケンシング及びゲノムデータベース解析から、トフェルセンの標的配列に遺伝子多型はほぼみられないことが示された。このことより、ほとんどすべての ALS 患者がトフェルセンの標的部位を有していることが示唆された。一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験で、トフェルセンはヒト SOD1 mRNA 量を減少させることが示された。ヒトトランスジェニックマウスモデル、ヒトトランスジェニックラットモデル及びサルにおいて、SOD1 mRNA 量の減少により、SOD1 タンパク質濃度を減少させる。トランスジェニックマウスモデルの結果により、ヒトでの用量設定の際の目標濃度とする EC_{50} が得られた。

種々の *in vitro* 試験、SOD1-G93A トランスジェニックマウス及び SOD1-G93A トランスジェニックラットを用いてトフェルセンの効力を評価した。その結果、内因性ヒト SOD1 を発現しているヒト細胞株における EC_{50} は約 1 μM と算出された。トランスジェニックマウスにおけるトフェルセンの mRNA 量減少作用の EC_{50} は約 1 μg/g（腰髄）と算出された。SOD1-G93A ラットでも同程度の EC_{50} が得られた。

トフェルセンは SOD1-G93A ラットの CNS 組織及び CSF 中の SOD1 タンパク質濃度を減少させた。概して、CNS 組織内 SOD1 mRNA 量は SOD1 タンパク質濃度よりも速やかに、より急速に減少した。mRNA 量の急速な分解は、mRNA とタンパク質の $t_{1/2}$ の違いにより部分的に説明できる。mRNA 量は速やかに減少し、2 週間以内に最大減少に達するが、CNS 組織内 SOD1 タンパク質の $t_{1/2}$ は約 20 日である［Farr 2011］。組織内タンパク質濃度の減少は mRNA 量の減少に比べ、急速ではなかったが、それでもその減少は有意であった。SOD1-G93A ラットにトフェルセンを単回投与したとき、CSF 中 SOD1 タンパク質濃度は PBS 投与対照と比較して 50%減少し、8 週後までその減少は持続した。

SOD1-G93A マウスを用いた一連の薬効薬理試験で、トフェルセンは、陰性対照投与群と比較して、SOD1 mRNA 量及び SOD1 タンパク質濃度を減少させることより、生存期間を延長させ、筋機能を増強させる運動ニューロンの筋神経支配を含む運動機能を改善した。

トフェルセンは、カニクイザルの CNS における SOD1 mRNA 量の低下にも有効であった。mRNA 抑制は腰髄、胸髄、頸髄及び運動皮質を含む CNS の複数領域で明らかであった。これらは ALS における CNS 病変にとって重要な領域である。

In silico 及び *in vitro* の試験により、トフェルセンの SOD1 mRNA への高い選択性が示された。2 つ未満の非相補的な塩基を有するオフターゲット候補遺伝子は認められなかった。トフェルセンの配列と 2 つのミスマッチ、欠失、又は挿入を有する 27 の遺伝子が同定された。これらのオフターゲット候補遺伝子は CNS では発現がみられない、トフェルセン処理により変化を示さない、又はトフェルセン処理でわずかに減少するものの、その効力（IC_{50}）はヒト細胞での SOD1 mRNA に対する効力の 100 倍超であったことから、トフェルセンは SOD1 mRNA に高い選択性を有すると考えられた。

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 9 ヵ月間反復投与毒性試験で実施した。ラットでは、トフェルセン 3 mg（1500 mg ヒト等価用量［HED］）を投与した動物に一過性の急性触覚過敏が認められた。3 mg 投与群では、覚醒、歩行、自発運動、呼吸及び感覚運動の観察項目スコアに低下が認められた。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}（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）。

カニクイザルでは、CNS 組織中 SOD1 mRNA 量の減少を反映して、CSF 中 SOD1 タンパク質濃度の変化が認められた。ラットの試験と同様に、サルにトフェルセンの 35 mg 投与により、13 週の時点（最終投与 1 週後）で、CSF 中 SOD1 タンパク質に約 45%の減少が認められた。

以上の非臨床薬理試験成績より、トフェルセンは SOD1 変異を有する ALS 患者の疾患修飾療法薬として開発することを裏付ける今までに報告されていない多くの情報が得られた。

7　　図表

本文中に記載。

8 参考文献

Cioffi CL, Garay M, Johnston JF, McGraw K, Boggs RT, Hreniuk D, et al. Selective inhibition of A-Raf and C-Raf mRNA expression by antisense oligodeoxynucleotides in rat vascular smooth muscle cells: role of A-Raf and C-Raf in serum-induced proliferation. Mol Pharmacol. 1997;51(3):383-9.

Farr GW, Ying Z, Fenton WA, Horwich AL. Hydrogen-deuterium exchange in vivo to measure turnover of an ALS-associated mutant SOD1 protein in spinal cord of mice. Protein Sci. 2011;20(10):1692-6.

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.

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 USA. 2002;99(3):1604-9.

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 1968;13(3):222-57.

Kaplan A, Spiller KJ, Towne C, Kanning KC, Choe GT, Geber A, et al. Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. Neuron. 2014;81(2):333-48.

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.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 2009;10(3):R25.1-10.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature. 2016;536(7616):285-91

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

Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. J Biol Chem. 2003;278(9):7108-18.

Wroe R, Wai-Ling Butler A, Andersen PM, Powell JF, Al-Chalabi A. ALSOD: the Amyotrophic Lateral Sclerosis Online Database. Amyotroph Lateral Scler. 2008;9(4):249-50.

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.

Zhang H, Cook J, Nickel J, Yu R, Stecker K, Myers K, et al. Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. Nat Biotechnol. 2000;18(8):862-7.

トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

1 薬理試験：一覧表 3
2 効力を裏付ける試験 7
3 副次的薬理試験 8
4 安全性薬理試験 9
5 薬力学的薬物相互作用試験 10

1 薬理試験：一覧表

概要			被験物質：トフェルセン（BIIB067、ISIS 666853）		
試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	試験番号	CTD での記載箇所
効力を裏付ける試験					
トフェルセンの結合部位解析	バイオインフォマティクス解析	該当なし	Isis Pharmaceuticals	EXP-[redacted]-AA0330	4.2.1.1-1
培養細胞におけるトフェルセンのヒト SOD1 mRNA 減少作用（*in vitro* 試験）	ヒト SH-SY5Y 細胞及び A431 細胞、カニクイザル初代培養肝細胞	*In vitro*	Isis Pharmaceuticals	EXP-[redacted]-AA0329	4.2.1.1-2
ヒト 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用量反応性評価	動物種／系統： マウス／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	Isis Pharmaceuticals	EXP-[redacted]-AA2184	4.2.1.1-3
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間に対するトフェルセンの投与時期の効果	動物種／系統： マウス／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	Biogen	ASO-13	4.2.1.1-4
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウスの生存期間及び運動協調性に対するトフェルセンの異なる 2 用量の作用	動物種／系統： マウス／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	Biogen	ASO-14	4.2.1.1-5
ヒト 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作用の電気生理学的及び組織学的試験	動物種／系統： マウス／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	Biogen	ASO-15	4.2.1.1-6

ICV = 脳室内、SOD1 = スーパーオキサイドジスムターゼ 1

1 薬理試験：一覧表（続き）

概要			被験物質：トフェルセン（BIIB067、ISIS 666853）		
試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	試験番号	CTD での記載箇所
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウスに対する作用の組織学的検討	動物種／系統： マウス／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	Biogen	ASO-27	4.2.1.1-7
ヒト 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効力の用量反応性解析	動物種／系統： マウス／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウス	ICV	Biogen	ASO-28	4.2.1.1-8
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける用量反応性評価	動物種／系統： ラット／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラット	IT	Isis Pharmaceuticals	EXP-[redacted]-AA2185	4.2.1.1-9
ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラットにおける SOD1 アンチセンスオリゴヌクレオチドのトフェルセンの *in vivo* における効力（RNA 量とタンパク質濃度）の経時変化	動物種／系統： ラット／ヒト SOD1-G93A トランスジェニックラット	IT、ICV	Isis Pharmaceuticals	EXP-[redacted]-AA2186	4.2.1.1-10
カニクイザルにおけるトフェルセンの PK/PD 相関	動物種／系統： サル／カニクイ	IT	[redacted]	666853-AS01	4.2.3.2-4

ICV = 脳室内、IT = 髄腔内、PD = 薬力学、PK = 薬物動態、SOD1 = スーパーオキサイドジスムターゼ 1

1　　薬理試験：一覧表（続き）

概要			被験物質：トフェルセン（BIIB067、ISIS 666853）		
試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	試験番号	CTD での記載箇所
副次的薬理試験					
ヒト TLR9 を過剰発現した HEK293XL 細胞への SOD1 ASO の処置とヒトケモカインの解析	ヒト TLR9 を過剰発現させたヒト HEK293XL 細胞	*In vitro*	Isis Pharmaceuticals	SOD1-HEKhTLR9-1	4.2.1.2-1
トフェルセンのオフターゲット遺伝子解析	ヒト SH-SY5Y 細胞及び A431 細胞、バイオインフォマティクス解析	*In vitro*	Isis Pharmaceuticals	EXP-[redacted]-AA0331	4.2.1.2-2
トフェルセンのオフターゲット遺伝子追加解析	ヒト A431 細胞及び iCell 神経細胞、バイオインフォマティクス解析	*In vitro*	Biogen and Ionis Pharmaceuticals	EXP-OT-[redacted]20[redacted]	4.2.1.2-3
安全性薬理試験					
ヒト胎児由来腎臓細胞に発現させた h*ERG* カリウムチャネルに及ぼすトフェルセンの影響	ヒト HEK293XL 細胞	*In vitro*	[redacted]	P067-19-04	4.2.1.3-1
カニクイザルを用いたトフェルセンの 13 週間反復 IT 投与毒性及び薬物動態並びに 13 週間回復性試験	動物種／系統： サル／カニクイ	IT	[redacted]	666853-AS01	4.2.3.2-4

ASO = アンチセンスオリゴヌクレオチド、IT = 髄腔内、SOD1 = スーパーオキサイドジスムターゼ 1、TLR = Toll 様受容体、h*ERG* = the human *ether-à-go-go-related gene*

1　　薬理試験：一覧表（続き）

概要			被験物質：トフェルセン（BIIB067、ISIS 666853）		
試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	試験番号	CTD での記載箇所
カニクイザルを用いたトフェルセンの 9 ヵ月間反復 IT 投与毒性及び薬物動態並びに 6 ヵ月間回復性試験	動物種／系統： サル／カニクイ	IT	[redacted]	P067-[redacted]-01	4.2.3.2-5
Sprague-Dawley ラットを用いたトフェルセンの単回 IT ボーラス投与毒性試験	動物種／系統： ラット／Sprague-Dawley	IT	[redacted], [redacted]	666853-AS03	4.2.3.1-1

IT = 髄腔内

2　　効力を裏付ける試験

M2.6.2.2 参照のこと。

3 副次的薬理試験

M2.6.2.3 参照のこと。

4 安全性薬理試験

概要				被験物質：トフェルセン（BIIB067、ISIS 666853）			
評価器官系	動物種／系統	投与方法	用量	各群の雌雄動物数	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号
呼吸器系/心血管系	*In vitro*（h*ERG*）	該当なし	1, 3, 10, 34 μM	該当なし	IC_{50} > 34 μM	適	P067-19-04
	ラット／Sprague-Dawley	腰髄 IT ボーラス投与、単回投与	0, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/回	雄 10 匹/雌 10 匹	3 mg で呼吸数の異常	適	666853-AS03
	サル/カニクイ	腰髄 IT ボーラス投与、反復投与	0, 4, 12, 35 mg/回	本試験 : 雄 3～5 匹／雌 3～5 匹 回復性試験：雄 2 匹／雌 2 匹	投与に関連した所見なし	適	666853-AS01
	サル/カニクイ	腰髄 IT ボーラス投与、反復投与	0, 4, 12, 35 mg/回	本試験：雄 4 匹／雌 4 匹 回復性験：雄 2 匹／雌 2 匹	投与に関連した所見なし	適	P067-[redacted]-01
腎臓系	サル/カニクイ	腰髄 IT ボーラス投与、単回投与	0, 4, 12, 35 mg/回	本試験 : 雄 3～5 匹／雌 3～5 匹 回復性験：雄 2 匹/雌 2 匹	投与に関連した所見なし	適	666853-AS01
	サル/カニクイ	腰髄 IT ボーラス投与、反復投与	0, 4, 12, 35 mg/回	本試験：雄 4 匹／雌 4 匹 回復性試験：雄 2 匹／雌 2 匹	投与に関連した所見なし	適	P067-[redacted]-01
中枢神経系	ラット／Sprague-Dawley	腰髄 IT ボーラス投与、単回投与	0, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/回	雄 10 匹／雌 10 匹	3 mg で覚醒、歩行、自発運動、感覚運動の観察項目スコアの低下	適	666853-AS03
	サル/カニクイ	腰髄 IT ボーラス投与、反復投与	0, 4, 12, 35 mg/回	本試験 : 雄 3～5 匹／雌 3～5 匹 回復性試験：雄 2 匹／雌 2 匹	脊髄反射の一過性の低下	適	666853-AS01
	サル/カニクイ	腰髄 IT ボーラス投与、反復投与	0, 4, 12, 35 mg/回	本試験：雄 4 匹／雌 4 匹 回復性試験：雄 2 匹／雌 2 匹	脊髄反射の一過性の低下、35 mg 群の雌 1 例に一般状態の有害影響	適	P067-[redacted]-01

GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、h*ERG* = the human *ether-à-go-go-related gene*、IC_{50} = 50%阻害濃度、IT = 髄腔内

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。