トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.7 臨床概要

2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法

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 背景および概観 6
1.1 製造工程 6
1.2 製剤 8
1.2.1 剤形 9
1.2.1.1 第 I 相及び第 I/II 相臨床試験 9
1.2.1.2 第 III 相臨床試験 9
1.2.1.3 市販用製剤 10
1.3 *In Vivo* 分析法 11
1.3.1 トフェルセン濃度測定法 19
1.3.1.1 ヒト血漿中、血清中、脳脊髄液中、及び組織中のトフェルセンの測定 19
1.3.1.1.1 ハイブリダイゼーション ELISA によるヒト血漿中、血清中、及び脳脊髄液中のトフェルセンの測定 19
1.3.1.1.2 ハイブリダイゼーション ELISA によるヒト CNS 組織中トフェルセンの測定 20
1.3.2 薬力学アッセイ 21
1.3.2.1 脳脊髄液中 SOD1 タンパク質の測定 21
1.3.2.1.1 [redacted]（ヒト脳脊髄液中 Cu/Zn SOD 定量のための ELISA） 21
1.3.2.1.2 脱アミド化 SOD1 ペプチドアッセイ 22
1.3.2.1.3 ヒト CNS 組織中 Cu/Zn SOD1 定量のための ELISA 22
1.3.3 免疫原性アッセイ 23
1.3.3.1 抗トフェルセン抗体の検出 23
1.3.3.1.1 ヒト血漿中抗トフェルセン IgG 及び IgM 抗体の検出（TS067-018VR） 23
1.3.4 疾患活性のバイオマーカーアッセイ 24
1.3.4.1 血漿中及び脳脊髄液中 pNfH の測定 24
1.3.4.1.1 ProteinSimple Simple Plex（ELLA™プラットフォーム上での血漿中、血清中、及び CSF 中 pNfH［72×1］アッセイのための Simple Plex™ アッセイ手順） 24
1.3.4.2 ヒト血漿中及び脳脊髄液中 NfL の測定 25
1.3.4.2.1 [redacted]による測定（ヒト CSF 及び血漿試料中 NfL 濃度の単一分子免疫測定法による検出） 25
1.3.4.2.2 [redacted]アッセイ（[redacted]でのニューロフィラメント軽鎖） 26
2 個々の試験結果の要約 28
2.1 *In Vitro* 溶出試験 28

2.2 バイオアベイラビリティ 28
2.3 生物学的同等性 28
2.4 食事の影響 28
3 全試験を通しての結果の比較と解析 29
4 参考文献 30
5 付録 31

略語・略号一覧表

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
101 試験	Study 233AS101	233AS101 試験
102 試験	Study 233AS102	233AS102 試験
aCSF	artificial cerebrospinal fluid	人工脳脊髄液
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
AEB	average enzymes per bead	ビーズ当たりの平均酵素数
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
CCP	confirmatory cut-point	確認カットポイント
CNS	central nervous system	中枢神経系
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
%CV	percent coefficient of variation	変動係数%
DIL QC	dilution QC	希釈 QC
DP	drug product	製剤
DS	drug substance	原薬
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫測定法
EQC	endogenous quality control	内因性 Quality Control
HV	healthy volunteer	健康被験者
hEQC	high endogenous quality control	高度の内因性 Quality Control
HPC	high positive control	高濃度の陽性コントロール
HQC	medium-high quality control	中等度～高度の Quality Control
HQC2	high quality control	高度の Quality Control
HRP	horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IT	intrathecal	髄腔内
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry	液体クロマトグラフィー－質量分析法
lEQC	low endogenous quality control	低度の内因性 Quality Control
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
LLPC	lowest positive control	最低濃度の陽性コントロール
LoB	limit of blank	ブランクの限界値
LoD	limit of detection	検出限界
LPC	low positive control	低濃度の陽性コントロール
LQC	low quality control	低度の Quality Control

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
MAG3	mercaptoacetyltriglycine	メルカプトアセチルトリグリシン
mEQC	mid-endogenous quality control	中等度の内因性 Quality Control
MRD	minimum required dilution	－
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NC	negative control	陰性コントロール
NfL	neurofilament light	ニューロフィラメント軽鎖
PBS	phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
PC	positive control	陽性コントロール
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
pNfH	phosphorylated neurofilament heavy chain	リン酸化ニューロフィラメント重鎖
PSCP	plate-specific cut-point	プレート固有のカットポイント
QC	quality control	－
%RE	percent relative error	相対誤差%
RFU	relative fluorescence unit	相対蛍光単位
RGP	resorufin β-D-galactopyranoside	レゾルフィン β-D-ガラクトピラノシド
RTU	ready-to-use	－
SBG	streptavidin-β-galactosidase	ストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼ
SOD1	superoxide dismutase 1	スーパーオキサイドジスムターゼ 1
SOD1-ALS	ALS associated with a mutation in the SOD1 gene	SOD1 遺伝子の変異を伴う ALS
T	theoretical	理論上
TE	total error	全誤差
TMB	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine	3,3′,5,5′-テトラメチルベンジジン
ULOQ	upper limit of quantitation	定量上限
USA	United States of America	アメリカ合衆国

1 背景および概観

スーパーオキサイドジスムターゼ 1（SOD1）遺伝子変異を伴う筋萎縮性側索硬化症（ALS）（SOD1-ALS）は、ALS 集団のうち約 2%であると考えられる。SOD1 の変異が ALS で変性を引き起こすメカニズムは十分に解明されていないが、SOD1 遺伝子における膨大な数の変異が異常機能獲得メカニズムを介して有害な SOD1 タンパク質の産生を誘導するという説が広く受け入れられている。この神経毒性は様々な一次性の原因から生じ、いずれも SOD1 タンパク質を凝集しやすくする［Allen 2003; Andersen 1995; Bruijn 1998; Ekhtiari Bidhendi 2018; Ilieva 2009; McCampbell 2018; Saccon 2013; Sau 2007］。トフェルセン（BIIB067）は、*SOD1* 遺伝子に変異を伴う ALS の治療のために開発された修飾 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（ASO）であり、髄腔内（IT）投与される。トフェルセンは SOD1 タンパク質のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）の 3’非翻訳領域の一部と相補的であり、Watson-Crick 塩基対形成によって結合する（ハイブリダイゼーション）。同種 mRNA に対するトフェルセンのこのハイブリダイゼーションの結果、SOD1 タンパク質の mRNA はリボヌクレアーゼ H により分解されて、SOD1 タンパク質の合成量と蓄積量が減少する。

トフェルセンの臨床開発には、2 種類の IT 投与用のトフェルセン製剤が用いられた。初期の臨床試験用の最初の製剤は、幅広い用量で IT 投与できるように開発された。そのため、この製剤では、濃縮した液剤（20 mg/mL）のバイアルと、それを希釈する人工脳脊髄液（aCSF）を含むバイアルの 2 バイアル仕様が採用された。推奨用量が決定されると、後の相の臨床試験用として aCSF 中にトフェルセン 6.7 mg/mL を含有する ready-to-use（RTU）製剤が開発された。6.7 mg/mL で投与した場合の両製剤の組成はほぼ同一であるが、添加剤の濃度がわずかに異なる（3.2.P.2.3「製造工程の開発の経緯－工程の開発の沿革」、Table 1）。製剤の塩濃度はいずれも、生体内のヒト脳脊髄液（CSF）中と近似している。

血漿中、血清中、及び CSF 中のトフェルセン濃度を測定するため、また、血漿中の免疫原性を評価するために生物分析法が開発され、開発プログラム全体を通して使用された。これらのアッセイは頑健な通常の試料分析を行うためバリデートされた。さらに、中枢神経系（CNS）組織試料中のトフェルセン濃度の測定には Fit-for-purpose アッセイが用いられた。

薬力学（PD）測定は、ヒト CSF 中 SOD1 タンパク質定量用に市販されているバリデートされた Fit-for-purpose アッセイを用いた。さらに、血漿中及び CSF 中のニューロフィラメント軽鎖（NfL）及びリン酸化ニューロフィラメント重鎖（pNfH）も Fit-for-purpose のバイオマーカーアッセイを用いて評価した。

1.1 製造工程

2 種類の製造工程（工程 A 及び工程 C）を用いて臨床試験用のトフェルセン製剤を製造した。追加の製造工程（工程 B）は、安定性試験用のトフェルセン製剤の製造に用いた。市販用のトフェルセン製剤を製造するために、追加の製造工程（工程 D）を予定している。それぞれの製造工程を Table 1 に要約する。

Table 1 Description of Drug Substance and Drug Product Used in the Development of Tofersen

Manufacturing Process		Process A ([redacted] Presentation)	Process B (RTU Presentation)	Process C (RTU Presentation)	Process D
Summary of key changes between processes		N/A	[redacted]		[redacted]
Material use		Clinical, stability	Stability	Clinical, stability	Commercial, stability
Clinical study	Phase 1	233HV101	N/A	N/A	N/A
	Phase 1/2	101 (Parts A and B)	N/A	N/A	N/A
	Phase 3	233AS102	N/A	101 (Part C), 233AS102	N/A
DS scale		[redacted] mmol	[redacted] mmol	[redacted] mmol	[redacted] mmol (Process D) [redacted] mmol (Process E)
DS concentration		[redacted] g lyophilized	[redacted] mg/mL liquid	[redacted] mg/mL liquid	[redacted] mg/mL
DP concentration		[redacted] mg/mL ([redacted] mg dose)	[redacted] mg/mL ([redacted] mg dose)	[redacted] mg/mL ([redacted] mg dose)	[redacted] mg/mL ([redacted] mg dose)
DP vial		[redacted] mL [redacted] glass vial	[redacted] mL [redacted] glass vial	[redacted] mL [redacted] glass vial	[redacted] mL [redacted] glass vial
DS manufacturing site		Ionis Pharmaceuticals, Inc, Carlsbad, CA, USA	Biogen, Research Triangle Park, NC, USA		
DP manufacturing site		[redacted], Italy	Biogen, Research Triangle Park, NC, USA		

原薬及び製剤の工程の同等性／同質性評価に関する試験方針と各試験の結果の概要を、それぞれ 3.2.S.2.6「製造工程の開発の経緯－工程の開発の経緯」及び 3.2.P.2.3「製造工程の開発の経緯－

工程の開発の沿革」に記載する。

1.2 製剤

トフェルセンの原薬は無色～微黄色澄明の溶液である。臨床試験用の原薬は、リン酸ナトリウム 1 mM、塩化ナトリウム 150 mM、塩化カリウム 3 mM、塩化カルシウム 1.4 mM、及び塩化マグネシウム 0.8 mM を含む pH 7.2 緩衝液で調製されていた。

トフェルセンの製剤は、無菌で発熱性物質を含まない単回使用の等張な注射剤として、臨床試験用に 2 つの異なる製剤が供給された。

最初の製剤（2 つのバイアルで構成される製剤）は、[redacted] mL を確実に投与できるように 1 本当たり [redacted] mL の溶液が充填された透明なガラス製バイアル（トフェルセン濃度 [redacted] mg/mL）と、希釈液として別のガラス製バイアルに入った [redacted] mL（採取容量 [redacted] mL）が供給された。

2 番目の製剤（RTU 製剤）は、[redacted] mL を確実に投与できるように十分な溶液が充填された透明な単回使用ガラス製バイアル（トフェルセン濃度 [redacted] mg/mL）が供給された。

臨床開発に用いたこれらの 2 種類の製剤（2 つのバイアルで構成される [redacted] mg/mL 製剤の製造工程と RTU の [redacted] mg/mL 製剤の製造工程）の主な違いは、前者では工程上で凍結乾燥した原薬を調製する必要があり、またバイアル中の製剤は後者と比べてより濃縮され、充填量が少ないことである。一方、RTU 製剤の工程では、ready-to-fill の液体原薬を用いたため追加の製造工程は必要とせず、またバイアル中の製剤は最終的に投与する濃度及び容量であった。

トフェルセン及び [redacted]（プラセボ）のバイアルはいずれも、ブチルゴム栓及びフリップオフキャップ付きアルミニウム製オーバーシールで密封されていた。製剤は IT ボーラス注射によって投与された。

その他の RTU 製剤のトフェルセンは [redacted] mg/mL 濃度で、安定性試験のみに使用された。

トフェルセン製剤は GMP に準拠して製造される。製剤及び製造工程の開発の概要は 3.2.P.2「製剤開発の経緯」に記載する。製剤組成の概要を Table 2 に、トフェルセンの臨床試験に使用されたロット番号を Table 3 に示す。

Table 2 Overview of Tofersen Clinical Formulations

	[redacted] Presentation	RTU Presentation	
Drug product protein concentration	[redacted] mg/mL	[redacted] mg/mL	[redacted] mg/mL
Excipients	[redacted] mM sodium phosphate [redacted] mM sodium chloride [redacted] mM potassium chloride [redacted] mM calcium chloride [redacted] mM magnesium chloride pH 7.2	[redacted] mM sodium phosphate [redacted] mM sodium chloride [redacted] mM potassium chloride [redacted] mM calcium chloride [redacted] mM magnesium chloride pH 7.2	

	[redacted] Presentation	RTU Presentation	
Use	Phase 1, 1/2, and 3; stability	Stability	Phase 3, stability
Container	Vial ([redacted] clear glass) Stopper ([redacted] mm, [redacted] butyl rubber) Seal ([redacted] mm, aluminum overseal, flip-off cap)	Vial ([redacted] clear glass) Stopper ([redacted] mm, [redacted] butyl rubber) Seal ([redacted] mm, aluminum overseal, flip-off cap)	
Clinical studies	233HV101 233AS101 (Parts A and B) 233AS102	N/A	233AS101 (Part C) 233AS102

原薬及び製剤の規格及び試験方法は、それぞれ 3.2.S.4.1「規格及び試験方法」及び 3.2.P.5.1「規格及び試験方法」に示す。

1.2.1 剤形

1.2.1.1 第 I 相及び第 I/II 相臨床試験

第 I 相（233HV101 試験）及び第 I/II 相（233AS101 試験［101 試験］パート A 及び B）の臨床試験では、[redacted] mg/バイアル（[redacted] mg/mL）のトフェルセン注射剤は、異物を認めない無色～微黄色澄明の溶液として供給された。この原薬は、Table 1 に示すように、工程 A に従って製造された。

製剤は 2 つのバイアルで構成され、[redacted] mL を確実に投与できるように [redacted] mL のトフェルセン溶液が充填された透明なガラス製バイアル（濃度[redacted] mg/mL）と、希釈液として使用する[redacted] [redacted] mL が充填されたバイアルが供給された。

第 I 相試験（233HV101 試験）では、放射性標識トフェルセン（^{99m}Tc-メルカプトアセチルトリグリシン［MAG3］トフェルセン）も供給された。この放射性標識トフェルセンは、親オリゴヌクレオチド配列、ヘキシルアミンリンカーに 5'末端で結合したトフェルセン、及び MAG3 として知られる金属キレート剤から成り、MAG3 は放射性同位体 ^{99m} テクネチウムを含有する。

1.2.1.2 第 III 相臨床試験

第 III 相臨床試験（101 試験パート C 及び 233AS102 試験［102 試験］）では、[redacted] mg/バイアル（[redacted] 又は [redacted] mg/mL）のトフェルセン注射剤は、異物を認めない無色～微黄色澄明の溶液として供給された。この原薬は、Table 1 に示すように、工程 A（[redacted] mg/mL）又は工程 C（[redacted] mg/mL）に従って製造された。

[redacted] mg/mL（[redacted] mg/バイアル）製剤は、RTU 製剤で、[redacted] mL を確実に投与できるように十分な溶液が充填されたバイアル製剤として供給された。

[redacted] mg/mL（[redacted] mg/バイアル）製剤は、2 つのバイアルで構成され、[redacted] mL を確実に投与できるように [redacted] mL のトフェルセン溶液が充填された透明なガラス製バイアルと、希釈液として使用する [redacted] [redacted] mL が充填されたバイアルが供給された。

102 試験の初期には、2 つのバイアルで構成される [redacted] mg/mL 製剤を使用した。ただし、その後、[redacted] mg/mL の RTU 製剤が利用可能になった時点で [redacted] mg/mL の RTU 製剤に変更した。

1.2.1.3 市販用製剤

市販用製剤に用いる 100 mg/バイアル（6.7 mg/mL）のトフェルセン注射液は、異物を認めない無色～微黄色澄明の溶液である。この原薬は、Table 1 に示す工程 D 及び工程 E に従って製造される。市販用製剤は、第 III 相臨床試験で使用した製剤と同等／同質である。15.0 mL を確実に投与できるように十分な溶液が入ったバイアル（濃度 6.7 mg/mL）で供給される。

Table 3 Formulations and Lot Numbers of Tofersen for Clinical Studies Conducted in the Development of Tofersen for Use in the Treatment of SOD1-ALS

CTD Module Number	Study No.	Study Title	Formulation	Tofersen Lot Numbers
5	233AS101 (Parts A and B)	A Study to Evaluate the Efficacy, Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of BIIB067 Administered to Adult Subjects with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Confirmed Superoxide Dismutase 1 Mutation	Tofersen [redacted] mg/mL solution (~[redacted] mg vial)	Part A: [redacted] Part B: [redacted]
5	233AS101 (Part C)	A Study to Evaluate the Efficacy, Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of BIIB067 Administered to Adult Subjects with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Confirmed Superoxide Dismutase 1 Mutation	Tofersen [redacted] mg/mL solution (~[redacted] mg vial)	[redacted]

CTD Module Number	Study No.	Study Title	Formulation	Tofersen Lot Numbers
5	233AS102	An Extension Study to Assess the Long-Term Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Effect on Disease Progression of BIIB067 Administered to Previously Treated Adults with Amyotrophic Lateral Sclerosis Caused by Superoxide Dismutase 1 Mutation	Tofersen [redacted] mg/mL solution (~[redacted] mg vial)	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted]
			Tofersen [redacted] mg/mL solution (~[redacted] mg vial)	[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted]
5	233HV101	A Phase 1, Safety, Tolerability, and Distribution Study of a Microdose of Radiolabeled BIIB067 Co-administered with BIIB067 to Healthy Adults	Tofersen [redacted] mg/mL solution (~[redacted] mg vial)	[redacted]

1.3 *In Vivo* 分析法

SOD1-ALS の治療を対象とした、トフェルセンの臨床開発中に測定した分析対象物質を Table 4 に要約する。

トフェルセンの各臨床試験の生物アッセイプラットフォーム、使用した方法、及び関連するアッセイのバリデーション／適格性評価に関する報告書の要約を Table 5 に示す。

臨床試験でヒト血漿中、血清中、及び CSF 中トフェルセン濃度の測定に使用した分析法は、バリデートされ、頑健な通常の試料分析のための選択性、精度、真度、感度、及びマトリックス中の安定性が適切であることが示された。Fit-for-purpose アッセイは、CNS 組織試料中のトフェルセン濃度の測定に適格であることが確認された。すべての分析法を 1.3.1.1 項に要約する。

ヒト血漿中の抗トフェルセン抗体の検出に使用されたアッセイはバリデートされており、その要約を 1.3.3.1 項に示す。

PD 測定は、バリデートされた、Fit-for-purpose の市販のヒト CSF 中総 SOD1 タンパク質定量アッセイを用いた。その要約を 1.3.2.1.1 項に示す。

pNfH 及び NfL（血漿中及び CSF 中）のバイオマーカー測定は、第 I/II 相臨床試験（101 試験パート A 及び B）で探索的評価項目として評価され、適格性が評価された Fit-for-purpose の方法を用いて行われた。

血漿中 NfL の測定は、第 III 相臨床試験（101 試験パート C 及び 102 試験）で副次評価項目として、また、サロゲートエンドポイントとして評価され、バリデートされた分析方法を用いて行われた。

また、CSF 中の脱アミド化 SOD1 ペプチドを測定するために、新規の探索的な質量分析バイオマーカーアッセイが開発された。脱アミド化された（例えば、修飾された）SOD1 ペプチドは、ミスフォールド又は異常な SOD1 タンパク質をより反映していると考えられる。トフェルセンの臨床開発中に使用されたバイオマーカーアッセイを 1.3.4 項に要約する。

Table 4 Analytes Measured in Clinical Studies Conducted in the Development of Tofersen for Use in the Treatment of ALS

Clinical Study Phase	Plasma/Serum Concentration	CSF Concentration	Immunogenicity	PD Biomarkers/ Secondary, Exploratory Biomarkers of Disease
233AS101 Phase 1/2/3	Tofersen	Tofersen	Anti-tofersen antibodies	Parts A and Part B (Phase 1/2): SOD1 in CSF (exploratory) pNfH (CSF and plasma; exploratory) NfL (CSF and plasma; exploratory) Part C (Phase 3): Total SOD1 in CSF (secondary) NfL (CSF [exploratory] and plasma [secondary]) pNfH (CSF and plasma; exploratory) Deamidated SOD1 peptide in CSF (exploratory)
233AS102 Phase 3	Tofersen	Tofersen	Anti-tofersen antibodies	SOD1 in CSF; secondary pNfH (CSF and plasma; secondary) NfL (CSF and plasma; secondary)
233HV101 Phase 1	Tofersen	Tofersen	N/A	N/A
233AS303 Phase 3	As of ■ ■■■ 20■, 52 participants remain in the natural history run-in period and 1 presymptomatic SOD1 mutation carrier with an elevated plasma Nfl was randomized to study treatment after the data cutoff date for the submission (16 January 2022)			

Table 5 Bioanalytical Methods Used to Measure Tofersen Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Biomarkers, and Immunogenicity

Analyte	Assay Type	Matrix	Assay Platform	Sensitivity	Method Validated/Fit-for-Purpose	Validation/ Qualification Site	Validation/ Qualification Reports	Clinical Study
Tofersen	PK	Plasma	Hybridization ELISA	1.00 ng/mL	Validated	[redacted]	TS067-004VR-R.1	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
		Serum	Hybridization ELISA	1.00 ng/mL	Validated	[redacted]	TS067-026VR	CSR 233HV101
		CSF	Hybridization ELISA	1.00 ng/mL	Validated	[redacted]	TS067-010VR-R.1	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2 CSR 233HV101

Analyte	Assay Type	Matrix	Assay Platform	Sensitivity	Method Validated/Fit-for-Purpose	Validation/ Qualification Site	Validation/ Qualification Reports	Clinical Study
		CNS Tissue	Hybridization ELISA	15.0 ng/g	Qualified (fit-for-purpose)	[redacted]	666853-MV03 and 666853-MV03 Amendment 1 (monkey tissue validation) TS067-016QR (human tissue qualification)	CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
SOD1	PD	CSF	Sandwich immunoassay	0.078 ng/mL	Validated (fit-for-purpose)	[redacted]	TS067-008VR and TS067-008VR-A	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
		CNS Tissue	Sandwich immunoassay	0.078 ng/mL	Exploratory	Biogen	Rsch-20[redacted]-07-12	CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
		CSF	LC-MS	Validation/quantification report not available at the time of this report.				

Analyte	Assay Type	Matrix	Assay Platform	Sensitivity	Method Validated/Fit-for-Purpose	Validation/ Qualification Site	Validation/ Qualification Reports	Clinical Study
pNfH	Biomarker	CSF	Immunoassay	7.46 pg/mL	Qualified (fit-for-purpose)	Biogen	TS033-107QR-A	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
						[redacted]	CJQ-[redacted]-376-VR01	CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
		Plasma	Immunoassay	7.46 pg/mL	Qualified (fit-for-purpose)	Biogen	TS033-107QR	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
						[redacted]	CJQ-[redacted]-382-VR01	CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2

Analyte	Assay Type	Matrix	Assay Platform	Sensitivity	Method Validated/Fit-for-Purpose	Validation/ Qualification Site	Validation/ Qualification Reports	Clinical Study
NfL	Biomarker	CSF	Single-molecule immunoassay	~0.454 pg/mL	Qualified (fit-for-purpose)	[redacted]	TS067-037QR	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2
		Plasma	Single-molecule immunoassay	~0.454 pg/mL	Qualified (fit-for-purpose)	[redacted]	TS067-037QR	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2 (participants who enrolled from 233AS101 Parts A and B only)
			Sandwich immunoassay	4.9 pg/mL	Validated	[redacted]	TS067-038VR	CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2 (participants who enrolled from 233AS101 Part C only)

Analyte	Assay Type	Matrix	Assay Platform	Sensitivity	Method Validated/Fit-for-Purpose	Validation/ Qualification Site	Validation/ Qualification Reports	Clinical Study
Anti-tofersen antibodies	Immunogenicity	Plasma	Immunoassay	121.64 ng/mL screening 78.13 ng/mL confirmation	Validated	[redacted]	TS067-018VR	CSR 233AS101 Parts A and B CSR 233AS101 Part C CSR 233AS102 Interim 1 CSR 233AS102 Interim 2

1.3.1 トフェルセン濃度測定法

1.3.1.1 ヒト血漿中、血清中、脳脊髄液中、及び組織中のトフェルセンの測定

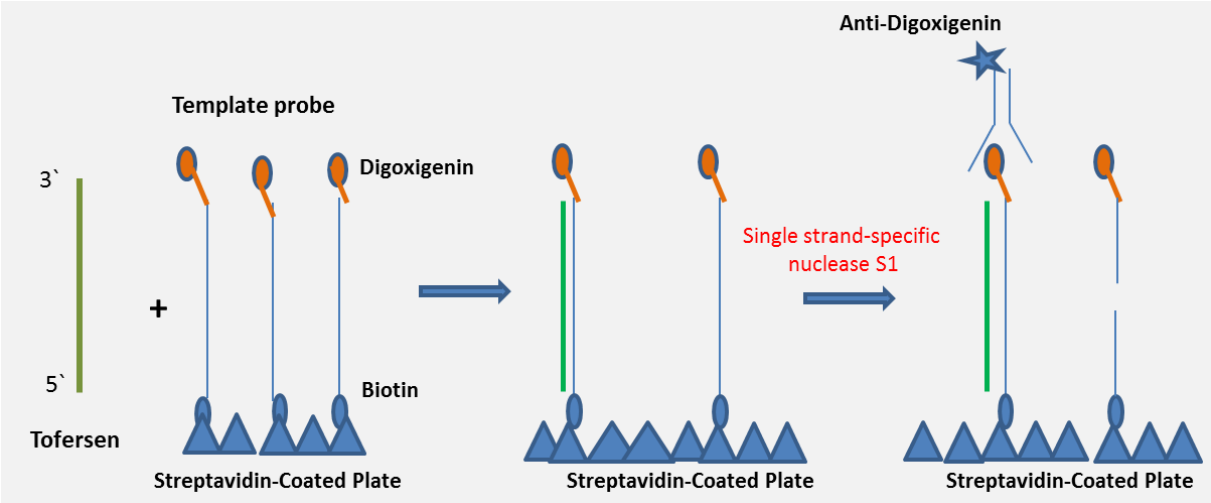
101 試験、102 試験、及び 233HV101 試験では、血漿中、血清中、CSF 中、及び CNS 組織中のトフェルセン濃度の測定に [redacted] でバリデート／適格性評価された方法を使用した。これらの方法を 1.3.1.1.1 項及び 1.3.1.1.2 項に要約する。

1.3.1.1.1 ハイブリダイゼーション ELISA によるヒト血漿中、血清中、及び脳脊髄液中のトフェルセンの測定

ハイブリダイゼーション酵素免疫測定法（ELISA）を用いて、ヒト血漿、血清、及び CSF 試料中のトフェルセン濃度を測定した（それぞれ「ヒト血漿中 BIIB067（ISIS 666853）測定のためのハイブリダイゼーション分析（K_2EDTA）」、「ヒト血清中 BIIB067（ISIS 666853）測定のためのハイブリダイゼーション分析」、及び「ヒト CSF 中 BIIB067（ISIS 666853）測定のためのハイブリダイゼーション分析」）。これらの方法は [redacted] でバリデートされた（それぞれ報告書番号 TS067-004VR-R.1、TS067-026VR、及び TS067-010VR-R.1）。

ハイブリダイゼーション ELISA は核酸塩基対形成の原理に基づいている（Figure 1）。トフェルセンは、3'末端でビオチン化されて 5'末端にジゴキシゲニンを有する相補的な切断プローブ（ISIS 666853 CutBioTEG プローブ）とハイブリッドを形成した。次に、このハイブリッドを形成した溶液を、ストレプトアビジンでコーティングした ELISA プレートに加えた。結合後に Sl ヌクレアーゼを添加してハイブリッドを形成しなかったプローブを分解し、ハイブリッドを形成しなかったプローブを除いてハイブリッドを形成したプローブを検出することが可能になった。ジゴキシゲニンとの結合により、ハイブリッドを形成した分析対象物を検出するために、アルカリホスファターゼ抱合抗ジゴキシゲニン抗体を使用した。蛍光定量の基質として [redacted] を使用した。

Figure 1 Hybridization ELISA to Detect Tofersen



4-パラメータロジスティック曲線近似と重み付け係数 $1/Y^2$ が検量線に適用され、その測定範囲は血漿、血清、及び CSF について 1.00 ng/mL（定量下限［LLOQ］）～100 ng/mL（定量上限［ULOQ］）であった。カーブフィッティングのために 0.500 及び 120 ng/mL の検量線用試料が追加された。

安定性は−20°C 及び−80°C でヒト血漿中では最長 425 日間、ヒト CSF 中では 368 日間まで確認された。また、ヒト血清中の安定性は−20°C で最長 65 日間、−80°C で最長 453 日間まで確認された。5 回の凍結融解の繰り返し（−80°C で凍結、室温で融解）から得た凍結融解安定性データも、両方のマトリックス中の安定性の基準を満たした。

ヒト血漿中トフェルセンのハイブリダイゼーション ELISA（報告書番号 TS067-004VR-R.1）、ヒト血清中トフェルセンのハイブリダイゼーション ELISA（報告書番号 TS067-026VR）、ヒト CSF 中トフェルセンのハイブリダイゼーション ELISA（報告書番号 TS067-010VR-R.1）のバリデーション報告書の要約を Table 5 に示す。バリデーション時の特性を Table 7、Table 9、及び Table 11 に示す。上記アッセイについての生物分析法のライフサイクルの情報を Table 6、Table 8、及び Table 10 に示す。

1.3.1.1.2 ハイブリダイゼーション ELISA によるヒト CNS 組織中トフェルセンの測定

ハイブリダイゼーション ELISA は、102 試験の被験者 3 例から採取したヒト剖検組織中のトフェルセン濃度の測定にも使用された（「ヒト脳組織中 BIIB067 測定のためのハイブリダイゼーション分析」）。この方法は、[redacted] でサルの脳組織を用いてバリデートされた後、ヒトの脳組織への使用に適格であることが確認された（それぞれ報告書番号 666853-MV03 及び TS067-016QR）。

このアッセイでは、組織試料を秤量し、ホモジナイゼーション用の緩衝液中でホモジナイズして最終濃度 50 mg tissue/mL とした後に、ハイブリダイゼーション ELISA を用いて分析した（1.3.1.1.1 項）。

4-パラメータロジスティック曲線近似と重み付け係数 $1/Y^2$ が検量線に適用され、その測定範囲は 15.0 ng/g（LLOQ）～1200 ng/g（ULOQ）であり、カーブフィッティングのために 10.0～1500 ng/g の検量線用試料が追加された。なお、脳組織の検量線はサルの脳組織のホモジネートで作成し、コントロール試料はヒトの脳組織のホモジネートで作成した。

サル脳組織中の安定性は−80°C で最長 448 日間まで確認された。5 回の凍結融解の繰り返し（−80°C で凍結、室温で融解）から得た凍結融解安定性データも安定性の基準を満たした。

サル組織中トフェルセンのハイブリダイゼーション ELISA のバリデーション報告書（報告書番号 666853-MV03 及び 666853-MV03 Amendment 1）及びヒト脳中トフェルセンのハイブリダイゼーション ELISA の適格性評価に関する報告書（報告書番号 TS067-016QR）の要約を Table 5 に示す。

バリデーション及び適格性評価時の特性を Table 12 に示す。

1.3.2 薬力学アッセイ

PD アッセイは、CSF 中 SOD1 タンパク質を定量するために Fit-for-purpose な方法を用いて実施した。この方法を以下に要約する。

1.3.2.1 脳脊髄液中 SOD1 タンパク質の測定

101 試験及び 102 試験のヒト CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度の測定には [redacted], [redacted] でバリデートされた方法が使用され、この方法を 1.3.2.1.1 項に要約する。このアッセイは総 SOD1 タンパク質を測定するものであり、未変性 SOD1 タンパク質と変異型又はミスフォールド SOD1 タンパク質を識別して測定することではなく、標的特異作用（Target Engagement）を間接的に測定するものである。さらに、ミスフォールド又は異常な SOD1 タンパク質をより反映していると考えられる脱アミド化 SOD1 ペプチドを測定するために、新規の質量分析アッセイが開発された。本概要作成の時点では、バリデーション及び適格性評価に関する報告は得られていない。

1.3.2.1.1 [redacted]（ヒト脳脊髄液中 Cu/Zn SOD 定量のための ELISA）

総 SOD1 タンパク質濃度を測定するために、免疫測定法を用いてヒト CSF 試料を分析した（「ヒト CSF 中 Cu/Zn SOD 定量のための ELISA」）。この方法は [redacted], [redacted]（[redacted]）でバリデートされた（報告書番号 TS067-008VR）。長期凍結の安定性はバリデーション報告書「TS067-008VR-A Addendum 1」に示した。

このアッセイではヒト Cu/Zn SOD Platinum ELISA キット（[redacted] 製、カタログ [redacted]）を用い、ヒト CSF 中 Cu/Zn SOD を定量した。

このアッセイのデザインは二重抗体サンドイッチ法に基づいた。抗ヒト Cu/Zn SOD でコーティングしたプレートがキットとともに供給された。コントロール、検量線用試料、及び Cu/Zn SOD を含むヒト試料をこのコーティングしたプレートに加え、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）抱合抗ヒト Cu/Zn SOD 抗体を添加した。Cu/Zn SOD は、固相化した抗体によって捕捉され、この捕捉された Cu/Zn SOD に HRP 抱合抗ヒト Cu/Zn SOD 検出抗体が結合した。インキュベーション後、未結合物質を取り除くためにプレートを洗浄した。結合型の HRP 抱合体を、比色基質のテトラメチルベンジジンを用いて検出した。酸性の停止液で発色を停止した。試料中の Cu/Zn SOD 存在量と正比例する発色強度をマイクロプレートリーダーで測定した。

4-パラメータロジスティック曲線近似と重み付け回帰モードが検量線に適用され、その測定範囲は 0.078 ng/mL（LLOQ）～5.000 ng/mL（ULOQ）であった。カーブフィッティングのために 0.039 及び 7.500 ng/mL の検量線用試料が追加された。

安定性は−20°C 及び−70°C でヒト CSF 中では最長 1126 日間まで確認された。

ヒト CSF 中 SOD1 免疫測定法のバリデーション報告書（報告書番号 TS067-008VR 及び TS067-008VR-A）の要約を Table 5 に示す。

バリデーション時の特性を Table 13 に示す。

1.3.2.1.2 脱アミド化 SOD1 ペプチドアッセイ

脱アミド化 SOD1 ペプチド濃度を測定するために、Biogen が開発した、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）による新規の方法を用いて、ヒト CSF 試料を分析した。この方法は公表文献［Gertsman 2019］に基づいた。検量線及び添加コントロール用の試料は SOD1 ペプチド合成品を用いて調製され、すべての検量線、コントロール、及びヒトの試料には、後に標準化するために、同位体標識された SOD1 ペプチド合成品を添加した。試料にはメタノールによるタンパク質の crash-out 手順を実施し、透明な上清を採取して乾燥させた。続いて、ナノフロー液体クロマトグラフィー三連四重極型質量分析計のシステム上で多重反応モニタリング法を用いて分析した。得られたシグナルは、非標識の脱アミド化 SOD1 ペプチド：同位体標識された脱アミド化 SOD1 ペプチドの比として算出された。

本概要作成時点では、バリデーション及び適格性評価に関する報告は得られていない。

1.3.2.1.3 ヒト CNS 組織中 Cu/Zn SOD1 定量のための ELISA

SOD1 濃度を測定するために、「カニクイザル CSF 中 SOD1 定量のための方法」から改変した免疫測定法を用いて、102 試験の剖検被験者から得たヒト CNS 組織試料を分析した。このカニクイザルにおける分析法は Biogen（マサチューセッツ州ケンブリッジ）で適格性が確認された（報告書番号 DevTS067-001QR）。

最初に、タンパク質分解酵素阻害剤を添加した放射性免疫沈降アッセイ溶解緩衝液中で組織をホモジナイズした。微量遠心機に組織溶解物を入れて遠心分離した。上清を新しい微量遠心管に移して−70ºC ± 10ºC で保管した。総タンパク質濃度は、BCA アッセイで測定し、SOD1 測定のために 0.5 mg/mL に標準化した。

SOD1 定量のための ELISA は 2 日間のアッセイであった。Day 1 には、マイクロタイタープレートを捕捉抗体 SD-G6（濃度 2.5 µg/mL）100 µL でコーティングし、4°C で一晩インキュベートした。Day 2 には、コーティングしたプレートを SuperBlock™ リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で 1 時間以上ブロックした後、PBS Tween 緩衝液で洗浄した。検量線、Quality Control（QC）（組換え Cyno SOD1 タンパク質で調製）、内因性 Quality Control（Cyno Motor Cortex Tissue 溶解物）、及びヒト組織の各試料（1：8000 で希釈）をプレートレイアウトに従って 100 µL/ウェルでプレートに添加した。室温で 90 分間振とうしながらインキュベートした後、プレートを洗浄し、2.5 µg/mL の SOD-100 抗体を 100 µL/ウェルで添加した。室温で 60 分間振とうしながらインキュベートした後、プレートを洗浄し、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G（IgG）HRP 抱合抗体を 100 µL/ウェルで添加した。プレートは、室温で 60 分間振とうしながらインキュベートした。最終洗浄後、3,3′,5,5′-テトラメチルベンジジン（TMB）基質を 100 µL/ウェルで添加し、プレートを遮光して 10 分間インキュベートした。1N HCl を 100 µL/ウェルで添加して反応を停止させた。プレートリーダーで各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。SOD1 濃度は、5 パラメータロジスティック曲線近似を用いて濃度に対して吸光度をプロットした検量線により求めた。

上記方法の検量線の測定範囲は 0.078～5.0 ng/mL であり、20 及び 10 ng/mL が上方アンカーポイントとして、0.039 及び 0.020 ng/mL が下方アンカーポイントとして用いられ、これらを除外するか又は用いるかは最もフィットした曲線に基づいた。

1.3.3 免疫原性アッセイ

バリデートされた免疫測定法を用いて抗トフェルセン抗体の有無について、ヒト血漿試料でスクリーニングを行った。この方法は、段階的アプローチでヒト血漿中の抗トフェルセン抗体の有無を検出するためにデザインされ、(1) 最初に試料の陽性又は陰性を確認するスクリーニングアッセイ、(2) スクリーニングで陽性を示した試料の特異性を評価する確認アッセイ、及び (3) 陽性が確認された試料について抗薬物抗体の力価を推定する抗体価アッセイという 3 つの要素で構成された。

1.3.3.1 抗トフェルセン抗体の検出

101 試験及び 102 試験の抗トフェルセン抗体の検出には [redacted] でバリデートされた方法が使用され、この方法を 1.3.3.1.1 項に要約する。

1.3.3.1.1 ヒト血漿中抗トフェルセン IgG 及び IgM 抗体の検出（TS067-018VR）

抗トフェルセン抗体を検出するために、免疫測定法を用いて、ヒト血漿試料を分析した（「ヒト血漿中抗 BIIB067 IgG 及び免疫グロブリン M［IgM］抗体の検出」）。この方法は [redacted] でバリデートされた（報告書番号 TS067-018VR）。

スクリーニング検査では、最初に、遊離アミントフェルセン（0.5 µg/mL）を、表面に薬剤を共有結合するイモビライザーアミノプレートに添加した。付着後、プレートを洗浄し（Tween 20 を 0.05%含有する PBS で 1 回）、PBS に溶解したブロッキング剤のカゼインを用いてブロックした。ブロッキング段階のインキュベーション終了時にプレートを洗浄した。陽性コントロール（抗トフェルセン抗体を添加したヒトプール血漿）、陰性コントロール（ヒトプール血漿）、及び試料を、ブロッキング緩衝液を用いて minimum required dilution（MRD）の 1 : 25 で希釈し、トフェルセンでコーティングしたプレート上でインキュベートした。プレートを洗浄し、希釈したタンパク質 A/G-HRP 抱合体を各ウェルに添加してインキュベートした。インキュベーション後にプレートを洗浄し、TMB 基質を添加した。結合型 HRP は TMB の発色生成物への変換を触媒する。その後、この反応を 1N HCl で停止させ、450 nm でプレートを測定した。発色基の 450 nm での吸光度は、血漿試料中に存在するヒト抗トフェルセン抗体の濃度と相関する。スクリーニング結果の判定のためのプレート固有のカットポイントは、各プレートについて統計的に算出したスクリーニングカットポイント係数 1.7342 に陰性コントロールの中央値を乗じることによって求めた。試料の 450 nm での吸光度測定値が、プレート固有のカットポイント以上になると、試料はスクリーニング陽性とされた。

スクリーニングで陽性となった試料は、その後、確認アッセイの対象となり、陽性シグナルの特異性を評価した。確認アッセイは、スクリーニング検査と同様の方法で行ったが、トフェルセンを濃度 50 µg/mL で添加した試料と添加しなかった試料の分析（MRD 後）も行った。その後、シグナル阻害率が算出された。試料のシグナル阻害率が、統計的に算出した確認カットポイント係数の 24.2630%以上の場合に試料は陽性とされた。

陽性であった試料は、抗体価を決定するために、段階希釈による抗体価アッセイでさらに評価された。抗体価アッセイはスクリーニングアッセイと同様の方法で行ったが、複数段階で希釈し

た試料が分析され、アッセイシグナルがプレート固有のカットポイント未満に低下するまでの試料の希釈の程度について評価した。抗体価アッセイの結果は、MRD を乗じたカットポイントより高い 450 nm での吸光度測定値が得られる最高希釈倍率として示された。

なお、抗体価アッセイの精度判定時に、プレート固有のカットポイントに基づいて定義された抗体価が評価され、許容できると判断された。

使用した陽性コントロールに基づき、スクリーニングアッセイの感度は 121.64 ng/mL、確認アッセイの感度は 78.13 ng/mL であった。

ヒト血漿中抗トフェルセン抗体アッセイのバリデーション報告書（報告書番号 TS067-018VR）の要約を Table 5 に示す。

バリデーション時の特性を Table 14 に示す。

1.3.4 疾患活性のバイオマーカーアッセイ

血漿中及び CSF 中の pNfH 及び NfL を定量するために Fit-for-purpose のバイオマーカーアッセイを用いた。これらの方法を以下に要約する。

1.3.4.1 血漿中及び脳脊髄液中 pNfH の測定

101 試験パート A 及び B 並びに 102 試験（101 試験パート A 及び B から登録した被験者のみ）の CSF 中及び血漿中 pNfH 濃度の測定には、Biogen で適格性が確認された方法を使用した。101 試験パート C 及び 102 試験（101 試験パート C から登録した被験者のみ）の CSF 中及び血漿中 pNfH 濃度の測定のために、同じ方法について [redacted] でも適格性が確認された。この方法を 1.3.4.1.1 項に要約する。

1.3.4.1.1 ProteinSimple Simple Plex（ELLA™プラットフォーム上での血漿中、血清中、及び CSF 中 pNfH［72×1］アッセイのための Simple Plex™アッセイ手順）

pNfH 濃度を測定するために、ELLA プラットフォーム上で実施する統合免疫測定法を用いて、ヒト血漿及び CSF の試料を分析した。この Fit-for-purpose の方法は、ヒトの血漿及び CSF での使用に適格であることが Biogen（マサチューセッツ州ケンブリッジ、報告書番号 TS033-107QR-1 及び TS033-107QR） [redacted]（[redacted]、報告書番号 CJQ-[redacted]-376-VR01 及び CJQ-[redacted]-382-VR01）で確認された。

この方法では、ProteinSimple ELLA Simple Plex Nf-H 試薬キット（Cat SPCKB-PS-000519）を利用して血漿中及び CSF 中 pNfH を ELLA アナライザーで検出した。

ELLA Simple Plex では自己完結型マイクロ流体カートリッジで免疫測定法を実施する。このカートリッジには事前既定の検量線（内蔵検量線）が組み込まれており、そこに内因性 Quality Control 及び試験試料を加える。コントロールは内製であったが、希釈緩衝液や洗浄緩衝液などの他のアッセイ試薬は免疫測定法キットで提供された。実施前に、ELLA アナライザーを初期化し、プレートラベル上のバーコードを用いてカートリッジをスキャンした。ヒトの血漿及び血清試料

は、希釈緩衝液を用いて 1 : 2 で希釈し、続いて、希釈した血漿又は血清試料 50 µL をそれぞれ適切なカートリッジの注入口にピペットで添加した。ヒト CSF 試料及び QC は、希釈緩衝液を用いて 1 : 4 で希釈し、続いて、希釈した CSF 試料 50 µL をそれぞれカートリッジの注入口にピペットで添加した。洗浄緩衝液も適切な緩衝液注入口に添加した。

カートリッジを ELLA アナライザーに装填すると、pNfH に対する捕捉抗体でコーティングした 3 つのガラスナノリアクターが組み込まれているマイクロ流路を介して試料及び QC の分析が実施される。未結合の分析対象物を洗浄後に検出試薬を添加した。検出試薬は pNfH に結合してガラスナノリアクター当たり 1 相対蛍光単位（RFU）のシグナルを生成し、その後、このシグナルは、事前既定及び校正された検量線から濃度補間された。基本的に、検討した各試料及びコントロールについて 3 回実施されるため、カートリッジの各注入ウェルからは 3 つの結果（データポイント）が得られる。したがって、この設定では試料の 1 回分析が許容できると判断された。

内蔵検量線は、5-パラメータロジスティック曲線近似を用いて濃度に対して RFU をプロットすることにより作成された。$1/Y^2$ 重み付け回帰が適用された。適格性が確認された検量線の濃度範囲は 7.46～28480 pg/mL であった。

ヒト血漿中及び CSF 中 pNfH アッセイの適格性評価に関する報告書の要約を Table 5 に示す。

Biogen での適格性評価時の特性を Table 15 及び Table 17 に示す。[redacted] での適格性評価時の特性を Table 16 及び Table 18 に示す。

1.3.4.2 ヒト血漿中及び脳脊髄液中 NfL の測定

NfL 濃度の測定には [redacted] で適格性評価され、[redacted] でバリデートされた方法を使用した。

第 I/II 相臨床試験（101 試験パート A 及び B）では、血漿中及び CSF 中 NfL 濃度が探索的評価項目として評価され、データは [redacted] プラットフォームで生成された。この [redacted] の血漿中 NfL 測定法は、101 試験（パート A 及び B のみ）から得た試料に使用されたが、その後、101 試験パート A 及び B から 102 試験に登録された被験者から得た試料にも使用された。[redacted] の CSF 中 NfL 測定法は、すべての試験相（101 試験パート A、B、及び C 並びに 102 試験）から得た試料に使用された。この方法を 1.3.4.2.1 項に要約する。

第 III 相臨床試験（101 試験パート C）では、血漿中 NfL 濃度が副次評価項目として評価され、データは [redacted] プラットフォームで生成された。プラットフォームの変更は第 I/II 相から第 III 相で行われた。その理由は、[redacted] のプラットフォームが [redacted] のプラットフォームと比較して分析性能が改善されていると Biogen が評価したためであった。この方法を 1.3.4.2.2 項に要約する。

1.3.4.2.1 [redacted] による測定（ヒト CSF 及び血漿試料中 NfL 濃度の単一分子免疫測定法による検出）

NfL 濃度を測定するために、免疫測定法を用いて、ヒト血漿及び CSF 試料を分析した（「ヒト CSF 及び血漿試料中 NfL 濃度の単一分子免疫測定法による検出」）。この Fit-for-purpose の方法は

[redacted]（[redacted]）で適格性が評価された（報告書番号 TS067-037QR）。

このアッセイでは [redacted] キット（[redacted] 製、製品番号 [redacted]）を利用し、ヒト血漿中及び CSF 中 NfL を定量した。

第一段階として、アッセイキットで提供された試料希釈液を用いてヒト CSF を 1：100 で、ヒト血漿を 1：4 で希釈した。希釈した CSF/血漿、キャリブレーター、及びコントロールのすべてをアッセイプレートに 1 回添加した。試料ウェルをプレートマップ上に割り付けて、アッセイプレートを [redacted] アナライザー上に装填した。過量のコーティングした常磁性捕捉ビーズを、試験試料、キャリブレーター、及びコントロールと混合した。キャリブレーター、コントロール、及び試験試料のウェルはいずれも単一のウェルから 2 点測定された。試料中に存在する NfL 分子は、抗 NfL 抗体でコーティングした捕捉ビーズによって捕捉された。洗浄後、ビオチン化検出抗体を捕捉ビーズと混合した。検出抗体は捕捉された分子に結合した。2 回目の洗浄後に、ストレプトアビジン-β-ガラクトシダーゼ（SBG）の抱合体を捕捉ビーズと混合した。SBG がビオチン化検出抗体と結合することによって、捕捉された分析対象物が酵素標識された。3 回目の洗浄後、捕捉ビーズは、レゾルフィン β-D-ガラクトピラノシド（RGP）基質溶液中に再懸濁されて [redacted] Disc に移された。続いて、個別の捕捉ビーズがアレイ中のマイクロウェル内にシールされた。分析対象物が捕捉・標識されていた場合は、ß-ガラクトシダーゼが RGP 基質を加水分解し、測定のためのシグナルとなる蛍光物質を生成した。単一の標識分子から、検出するために十分な 30 秒間の蛍光シグナルが得られ、[redacted] の光学システムによって計測された。

4-パラメータロジスティック曲線近似のデータ縮約法（4PL、$1/Y^2$ 重み付け）を用いて、濃度に対してビーズ当たりの平均酵素数をプロットすることにより作成された検量線上で NfL 濃度を算出した。この方法での検量線の測定範囲は、アッセイの適格性評価に基づきおおむね 0.454～440.0 pg/mL であった。製造業者の製造ロット間でわずかな違いがあるため、各測定での正確な測定範囲は試薬のロット番号によって異なる。

ヒト血漿中及び CSF 中 NfL アッセイの適格性評価に関する報告書（報告書番号 TS067-037QR）の要約を Table 5 に示す。

[redacted] での適格性評価時の特性を Table 19 に示す。

1.3.4.2.2 [redacted] アッセイ（[redacted] でのニューロフィラメント軽鎖）

NfL 濃度を測定するために、免疫測定法を用いてヒト EDTA 血漿試料を分析した（「[redacted] IM での NfL」）。この Fit-for-purpose の方法は [redacted]（[redacted]）でバリデートされた（報告書番号 TS067-038VR）。

このアッセイでは [redacted] アッセイの NfL アッセイ用試薬（[redacted] 製、パーツ [redacted]、[redacted]、[redacted]、及び [redacted]）を利用し、ヒト血漿中 NfL を定量した。

[redacted] アッセイは、直接化学発光を用いた 2 サイトサンドイッチ免疫測定法である。[redacted] は、試料間の変動が低減され、プレートの偏りが最小限となる完全自動化ランダムアクセス型装置である。この装置は、適切な品質管理を利用して性能をモニタリングすることで内部較正され

る。このアッセイは 2 種類のモノクローナルマウス抗体を使用し、各抗体は特有の NfL エピトープを認識する。

試料分析では、コントロール、キャリブレーター、及び NfL を含むヒト血漿の各試料を試験管に添加してシステム上に装填した。続いて、このシステムは、固相試薬（ストレプトアビジンと抱合した常磁性粒子に結合したビオチン化マウスモノクローナル抗 NfL 抗体から成る）、Lite Reagent（化学発光検出用アクリジニウムエステル標識された抗 NfL モノクローナル抗体）を補助ウェル試薬とともに試験管に添加し、試料中に存在する NfL と結合するまで 37ºC でインキュベートした。次に、試験管を磁気にあてて混合液から固相を分離した。未結合の試薬がある場合は、吸引してキュベットを洗浄し、試薬（Lite Reagent）と NfL 固相との複合体のみが残るようにした。

このシステムでは、酸と塩基を添加してアクリジニウムエステルを酸化し、この化学発光反応による発光を相対発光量として測定した。蓄積された発光シグナルは試料の NfL 濃度に直接相関していた。

NfL アッセイは 2 点検量線を使用し、結果は平均濃度として要約した。較正が許容されるためには、コントロールが 3 用量すべてについて品質管理の判定基準を満たさなければならなかった。血漿中 NfL についてのアッセイの濃度範囲は 4.9～477 pg/mL であった。

ヒト血漿中での安定性は−20°C で最長 3 ヵ月まで、−80°C で最長 1 年まで確認された。

ヒト血漿中 NfL アッセイのバリデーション報告書の要約を Table 5 に示す。

[redacted] での適格性評価時の特性を Table 20 に示す。

2 個々の試験結果の要約

トフェルセンは、CSF への IT 注射によって CNS 組織内の標的とする作用部位の近傍に投与することができる。トフェルセンは、IT 投与経路及び関連する製剤に基づき、生物薬剤学に関する試験は検討されていない。トフェルセンの薬物動態（PK）、PD、及び免疫原性は 2.7.2「臨床薬理の概要」に示す。

2.1 *In Vitro* 溶出試験

トフェルセンは IT 投与用の水溶液として調製されるため、*in vitro* 溶出試験は該当しない。

2.2 バイオアベイラビリティ

トフェルセンは、溶液の剤形で CSF に直接投与されるため、バイオアベイラビリティ試験は実施しなかった。

2.3 生物学的同等性

2 つのバイアルで構成される製剤（初期の臨床試験で使用）及び RTU 製剤（直近の臨床試験で使用、市販用の予定）の投与製剤はほぼ同一であるため、生物学的同等性試験は実施しなかった。

2.4 食事の影響

トフェルセンは IT 注射によって投与し、吸収の過程を経ずに CSF から標的とする CNS 組織への分布が十分可能なため、トフェルセンの吸収に対する食事の影響はないと考えられ、検討しなかった。

3 全試験を通しての結果の比較と解析

トフェルセンは、IT 投与経路及び関連する製剤に基づき、生物薬剤学に関する試験は検討されていないため、全試験を通しての比較は該当しなかった。

トフェルセンの PK、PD、及び免疫原性は、2.7.2「臨床薬理の概要」に示す。

4 参考文献

Allen S, Heath PR, Kirby J, et al. Analysis of the Cytosolic Proteome in a Cell Culture Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Alterations to the Proteasome, Antioxidant Defenses, and Nitric Oxide Synthetic Pathways. J Biol Chem. 2003;278(8):6371-83. Epub 20021209.

Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with Homozygosity for an Asp90Ala Mutation in CuZn-Superoxide Dismutase. Nat Genet. 1995;10(1):61-6.

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

Ekhtiari Bidhendi E, Bergh J, Zetterström P, et al. Mutant Superoxide Dismutase Aggregates from Human Spinal Cord Transmit Amyotrophic Lateral Sclerosis. Acta Neuropathol. 2018;136(6):939-953. Epub 20181003.

Gertsman I, Wuu J, McAlonis-Downes M, et al. An endogenous peptide marker differentiates SOD1 stability and facilitates pharmacodynamic monitoring in SOD1 amyotrophic lateral sclerosis. JCI Insight. 2019;4(10) Epub 20190516.

Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. J Cell Biol. 2009;187(6):761-72.

McCampbell A, Cole T, Wegener AJ, et al. Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. J Clin Invest. 2018;128(8):3558-3567. Epub 2018/07/16.

Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RK, Fisher EM, et al. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? Brain. 2013;136(Pt 8):2342-58.

Sau D, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, et al. Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. Hum Mol Genet. 2007;16(13):1604-18. Epub 2007/05/15.

5 付録

Appendix A. Tofersen Concentration Assay: Summary of Method Performance in Plasma, Serum, and CSF and Bioanalytical Life Cycle Information

Table 6: Bioanalytical Method Life Cycle Information for the Tofersen Plasma PK Hybridization Assay

	Method Validation
Analyte	Analyte name: tofersen (also known as BIIB067 and ISIS 666853)
Validation type	Full analytical validation
eCTD reference number	If available: N/A
Method ID	AP.3450342.HPL
Duration of time method is in use	[redacted] 20[redacted] to present
Bioanalytical site	[redacted], [redacted], [redacted], Canada
Matrix	Plasma (K_2EDTA)
Platform	Hybridization (ELISA)
Format	Validated hybridization ELISA method for the determination of BIIB067 in human plasma using a complementary cutting BIOTEG probe specific to tofersen (i.e., capture) and a Rabbit Polyclonal Anti-BIIB067 Antibody (i.e., detection).
Stock reference, lot number, expiration date	Stock: ISIS 666853 Lot: [redacted] Expiration date: [redacted] 20[redacted]
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	1.00 to 100 ng/mL
Matrix study population	ALS disease plasma
Link to reports and applicable amendments	TS067-004VR-R.1
Synopsis of amendment history	Amended Report TS067-004VR-R.1 included long-term stability assessment and update of tables, with additional assays performed to evaluate this.

Table 7: Summary Method Performance for the Determination of the Concentration of Tofersen in Human Plasma (TS067-004VR-R.1)

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	A Hybridization Assay for the determination of BIIB067 (formerly ISIS 666853) in Human Plasma (K_2EDTA) TS067-004VR-R.1		
Method description	Hybridization ELISA for the determination of tofersen in human plasma using a complementary cutting probe that was specific to the antisense oligonucleotide		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Tofersen (formerly ISIS 666853) drug product in undiluted normal human plasma at concentrations ranging from 0.500 to 120 ng/mL. Quantitative range: 1.00 to 100 ng/mL. Accessory standards/anchor points: 0.500 and 120 ng/mL		
Validated assay range	1.00 to 100 ng/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Tofersen (formerly ISIS 666853) drug product in undiluted normal human plasma at 1.00 ng/mL (ULOQ), 3.00 ng/mL (QC1), 30.0 ng/mL (QC2), 75.0 ng/mL (QC3), and 100 ng/mL (ULOQ)		
Minimum required dilutions (MRDs)	The minimum dilution at which all individual samples demonstrate acceptable accuracy from multiple subsequent dilutions was assessed and implemented in the runs		
Source and lot of reagents	Calibrators and QCs: Tofersen Bioanalytical Solution Standard (Lot [redacted]; Ionis Pharmaceuticals, Inc) Probe: ISIS 666853cutBIOTEG Probe (Lots [redacted] and [redacted]; Ionis Pharmaceuticals, Inc) (Additional commercially available reagents are detailed in TS067-004VR-R.1.)		
Regression model and weighting	Four-parameter logistic model with a weighting factor of $1/Y^2$		
Validation Parameters	Method Validation Summary		Source Location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100.00 ng/mL	Table 12 of report TS067-004VR-R.1
	Cumulative accuracy (%RE) from LLOQ to ULOQ	-3.8% to 4.4%	Table 12 of report TS067-004VR-R.1
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	≤ 5.9%	Table 12 of report TS067-004VR-R.1

Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%RE) in 5 QCs		Table 14 of report TS067-004VR-R.1
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	-1.4%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	-3.2%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	-2.9%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	-1.1%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	0.3%	
	Inter-batch %CV		Table 14 of report TS067-004VR-R.1
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	7.3%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	4.9%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	8.3%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	5.7%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	13.0%	
	Total error (TE)		Table 14 of report TS067-004VR-R.1
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	8.7%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	8.1%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	11.2%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	6.8%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	13.2%	
Selectivity and matrix effect	10/10 blank normal plasma samples were < LLOQ. 10/10 blank ALS plasma samples were < LLOQ. 100% (10/10) of individual donor lots of normal plasma recovered between 81.5% and 106.6% nominal at QC1 (3.00 ng/mL) and 93.5% and 118.0% nominal at QC3 (75.00 ng/mL) 100% (10/10) of individual donor lots of ALS plasma recovered between 95.7% to 111.2% of nominal at QC1 (3.00 ng/mL) and between 89.0% to 114.0% of nominal at QC3 (75.00 ng/mL)		Table 1 and Table 2 of report TS067-004VR-R.1

Interference and specificity	ADA Interference 2/2 blank normal plasma samples spiked with 10.0 µg/mL of ADA were < LLOQ. QC1 (3.00 /ng/mL) sample spiked with 10.0 µg/mL ADA had a mean recovery of 93.8% nominal (0.2% CV). QC3 (75.0 ng/mL) samples spiked with 10.0 µg/mL ADA had a mean recovery of 85.3% nominal (4.5% CV). Metabolite Cross-Reactivity and Interference 3 putative tofersen metabolites, ISIS 764434 (n-1 from 3'-end), ISIS 764435 (10-mer, 5' -end 10-mer), ISIS 764437 (n-15, 5' -end 5-mer), were spiked into human plasma samples at a theoretical concentration of 75.0 ng/mL. ISIS 764435 and ISIS 764437 did not cross-react (< LLOQ). ISIS 764434 cross-reacted with tofersen method to a minimal extent (1.79%). Low (3.00 ng/mL) and high (75.0 ng/mL) tofersen samples were spiked with increasing concentrations of each of the putative metabolites. No metabolite interference was detected, as the accuracy of the mean concentrations was within ± 20% of the nominal values at each QC level.	Tables 3, 6, 7, 8, and 9 of report TS067-004VR-R.1
Hemolysis effect	One lot of unspiked 5% (v/v) hemolyzed plasma was < LLOQ when analyzed in 6 replicates. 5% (v/v) hemolyzed plasma samples spiked with tofersen gave a mean %recovery of 81.5% at the 3.00-ng/mL concentration and 88.3% at the 75-ng/mL concentrations when analyzed in 6 replicates.	Table 4 of report TS067-004VR-R.1
Lipemic effect	10/10 blank lipemic plasma samples were < LLOQ. 10 lipemic plasma samples spiked with tofersen gave %recoveries between 81.7% and 118.9% of nominal at the 3.00-ng/mL concentration and between 92.6% and 117.1% of nominal at the 75-ng/mL concentration.	Table 5 of report TS067-004VR-R.1

Dilution linearity and hook effect	100 µg/mL tofersen in human plasma diluted: • 1000-fold: 88.6% recovery (5.2% CV) • 4000-fold: 99.2% recovery (3.7% CV) • 20,000-fold: 104.7% recovery (3.6% CV) No prozone was observed at tofersen ≤ 10,0000 ng/mL.	Table 10 and 11 of report TS067-004VR-R.1
Bench-top/process stability	Ambient temperature: stable for 19 h • QC1: %recovery = 83.1% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 94.1% (n = 6) 4ºC: stable for 19 h • QC1: %recovery = 83.9% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 89.4% (n = 6)	Table 16 and 17 of report TS067-004VR-R.1
Freeze-thaw stability	Freeze-thaw: stable for 5 cycles • QC1: %recovery = 90.2% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 93.9% (n = 6)	Table 15 of report TS067-004VR-R.1
Long-term storage	• Long term at -20ºC: stable up to 425 days • QC1: %recovery = 113.1% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 91.3% (n = 6) Long term at -80ºC: stable up to 425 days • QC1: %recovery = 102.0% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 98.3% (n = 6)	Table 26 and 27 of report TS067-004VR-R.1
Parallelism	Not evaluated	N/A
Carry over	Not evaluated	N/A
Method Performance in Study 101 TS067-005BR-R.1		
Assay passing rate	85.8% (115 of 134 sample analysis runs)	Table 1 of report TS067-005BR-R.1
Standard curve performance	• Cumulative % theoretical range: 98.1% to 102.9% • Cumulative precision: ≤ 6.5% CV	Table 3 of report TS067-005BR-R.1
QC performance	• Cumulative % theoretical range: 98.4% to 106.7% • Cumulative precision: ≤ 13.9% CV • TE: ≤ 19.5%	Table 4 of report TS067-005BR-R.1
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed; 83% of the samples met the prespecified criteria.	Table 7 of report TS067-005BR-R.1

Study sample analysis/ stability	All the plasma samples were analyzed within the established stability of 5 freeze-thaw (F/T) cycles and 425 days (-80°C), except for 1 sample that required more than 7 F/T cycles and 6 plasma samples that were analyzed outside of the 425 days proven stability (460 to 1625 days). Extended stability evaluation is in progress.	Section 6.5 of report TS067-005BR-R.1
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100 ng/mL	
Method Performance in Study 233AS102 TS067-013BR-IN.1		
Assay passing rate	91.0% (71 of 78 sample analysis runs)	Table 1 of report TS067-013BR-IN.1
Standard curve performance	• Cumulative % theoretical range: 98.8% to 103.0% • Cumulative precision: ≤ 7.2% CV	Table 3 of report TS067-013BR-IN.1
QC performance	• Cumulative % theoretical range: 98.5% to 104.7% • Cumulative precision: ≤ 12.6% CV • TE: ≤ 15.5%	Table 4 of report TS067-013BR-IN.1
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed as this was an interim analysis of samples.	NA
Study sample analysis/ stability	All study samples were analyzed within the proven stability period (< 425 days stored in a freezer set to maintain -80°C), except for 13 samples (427 to 1005 days). Extended stability evaluation is in progress.	Section 6.5 of report TS067-013BR-IN.1
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100 ng/mL	

Table 8: Bioanalytical Method Life Cycle Information for the Tofersen Serum PK Hybridization Assay

	Method Validation
Analyte	Analyte name: tofersen (also known as BIIB067 and ISIS 666853)
Validation type	Full analytical validation
eCTD reference number	If available: N/A
Method ID	AP.3450787.HSE.03
Duration of time method is in use	[redacted] 20[redacted] to [redacted] 20[redacted]
Bioanalytical site	[redacted], [redacted], [redacted], Canada
Matrix	Serum
Platform	Hybridization (ELISA)
Format	Validated hybridization ELISA method for the determination of BIIB067 in human serum using a complementary cutting BIOTEG probe specific to tofersen (i.e., capture) and a Rabbit Polyclonal Anti-BIIB067 Antibody (i.e., detection).
Stock reference, lot number, expiration date	Stock: ISIS 666853 Lot: [redacted] Expiration date: [redacted] [redacted] 20[redacted]
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	1.00 to 100 ng/mL
Matrix study population	Healthy serum
Link to reports and applicable amendments	TS067-026VR
Synopsis of amendment history	N/A

Table 9: Summary Method Performance for the Determination of the Concentration of Tofersen in Human Serum (TS067-026VR)

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	A Hybridization Assay for the determination of BIIB067 (Formerly ISIS 666853) in Human Serum TS067-026VR		
Method description	Hybridization ELISA for the determination of tofersen in human serum using a complementary cutting probe that was specific to the antisense oligonucleotide		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Tofersen (formerly ISIS 666853) drug product in undiluted normal human serum at concentrations ranging from 0.500 to 120 ng/mL. Quantitative range: 1.00 to 100 ng/mL Accessory standards/anchor points: 0.500 and 120 ng/mL		
Validated assay range	1.00 to 100 ng/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Tofersen (formerly ISIS 666853) drug product in undiluted normal human serum at 1.00 ng/mL (ULOQ), 3.00 ng/mL (QC1), 30.0 ng/mL (QC2), 75.0 ng/mL (QC3), and 100 ng/mL (ULOQ)		
Minimum required dilutions (MRDs)	The minimum dilution at which all individual samples demonstrate acceptable accuracy from multiple subsequent dilutions was assessed and implemented in the runs.		
Source and lot of reagents	Calibrators and QCs: Tofersen Bioanalytical Solution Standard (Lot [redacted]; Ionis Pharmaceuticals, Inc) Probe: ISIS 666853cutBIOTEG Probe (Lots [redacted]; IDT and [redacted]; Midland) (Additional commercially available reagents are detailed in TS067-026VR.)		
Regression model and weighting	Four-parameter logistic model with a weighting factor of $1/Y^2$		
Validation parameters	Method Validation summary		Source Location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100 ng/mL	Table 1 of report TS067-026VR
	Cumulative accuracy (%RE) from LLOQ to ULOQ	-2.5% to 4.6%	Table 1 of report TS067-026VR
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	≤ 6.9%	Table 1 of report TS067-026VR
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%RE) in 5 QCs		Table 4 of report TS067-026VR
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	-11.7%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	-7.9%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	-9.8%	

	(QC3) 75.0 ng/mL	-2.7%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	3.3%	
	Inter-batch %CV		Table 4 of report TS067-026VR
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	15.4%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	6.7%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	4.5%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	8.5%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	12.7%	
	Total error (TE)		Table 4 of report TS067-026VR
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	27.1%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	14.6%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	14.3%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	11.2%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	16.0%	
Selectivity and matrix effect	10/10 blank normal plasma samples were < LLOQ. 10/10 blank ALS plasma samples were < LLOQ. 80% (8/10) normal and 90% (9/10) ALS lots spiked at 1.00 ng/mL recovered within ± 25% RE. 80% (8/10) normal and 100% (10/10) lots spiked at 75.0 ng/mL recovered within ± 20% of RE.		Tables 5, 6, and 7 of report TS067-026VR
Interference and specificity	Not evaluated		N/A
Hemolysis effect	Not evaluated		N/A
Lipemic effect	Not evaluated		N/A

Dilution linearity and hook effect	100 µg/mL tofersen in human serum diluted • 1000-fold: - Original run: 99.8 mean %recovery (4.8%CV) - Repeat run: 98.8 mean %recovery (6.5%CV) • 4000-fold: - Original run: 107.7 mean %recovery (3.8%CV) - Repeat run: 89.3 mean %recovery (2.9 %CV) • 20,000-fold: - Original run: 100.8 mean %recovery (2.5% CV) - Repeat run: 88.3 mean %recovery (3.2% CV) No prozone observed at tofersen ≤ 10,0000 ng/mL	Tables 8, 9, 10, and 11 of report TS067-026VR
Bench-top/process stability	Ambient temperature: stable for 19 h 18 min • QC1: % theoretical = 100.5% (n = 6) • DIL QC: % theoretical = 103.8% (n = 6) 4ºC: stable for 22 h 14 min • QC1: % theoretical = 95.0% (n = 6) • DIL QC: % theoretical = 91.5% (n = 6)	Tables 13 and 14 of report TS067-026VR
Freeze-thaw stability	Freeze-thaw: stable for 5 cycles • QC1: % theoretical = 105.4% (n = 6) • DIL QC: % theoretical = 108.4% (n = 6)	Table 15 of report TS067-026VR
Long-term storage	Long term at -20ºC: stable up to 65 days • QC1: % theoretical = 114.4% (n = 6) • DIL QC: % theoretical = 104.8% (n = 6) Long term at -80ºC: stable up to 453 days • QC1: % theoretical = 84.1% (n = 6) • DIL QC: % theoretical = 104.3% (n = 6)	Tables 18 and 23 of report TS067-026VR
Parallelism	Not evaluated	N/A
Carry over	Not evaluated	N/A
Method Performance in Study 233HV101 TS067-027BR		
Assay passing rate	100% (6 of 6 serum sample analysis runs)	Table 1 of report TS067-027BR
Standard curve performance	Cumulative % theoretical range: 97.4% to 104.3% Cumulative precision: ≤ 10.0% CV	Table 5 of report TS067-027BR
QC performance	Cumulative % theoretical range: 103.2% to 107.1% Cumulative precision: ≤ 16.6% CV TE: ≤ 23.7%	Table 7 of report TS067-027BR
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed and 71% of the samples met the prespecified criteria.	Table 12 of report TS067-027BR

Study sample analysis/ stability	All serum samples were analyzed within the proven stability period of 453 days (refer to Table 23 of report TS067-026VR) in a freezer set to maintain -80°C. Extended stability evaluation is in progress.	Section 6.5 of report TS067-027BR
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100 ng/mL	

Table 10: Bioanalytical Method Life Cycle Information for the Tofersen CSF PK Hybridization Assay

	Method Validation
Analyte	Analyte name: tofersen (also known as BIIB067 and ISIS 666853)
Validation type	Full analytical validation
eCTD reference number	If available: N/A
Method ID	AP.3450337.CSF.04
Duration of time method is in use	[redacted] 20[redacted] to present
Bioanalytical site	[redacted], [redacted], [redacted], Canada
Matrix	CSF
Platform	Hybridization (ELISA)
Format	Validated hybridization ELISA method for the determination of BIIB067 in human plasma using a complementary cutting BIOTEG probe specific to tofersen (i.e., capture) and a Rabbit Polyclonal Anti-BIIB067 Antibody (i.e., detection)
Stock reference, lot number, expiration date	Stock: ISIS 666853 Lot: [redacted] Expiration date: [redacted] [redacted] 20[redacted] (updated to [redacted] [redacted] 20[redacted], since the report was issued)
Calibration range from the lower limit of quantitation (LLOQ) to the upper limit of quantitation (ULOQ)	1.00 to 100 ng/mL
Matrix study population	ALS disease CSF
Link to reports and applicable amendments	TS067-010VR-R.1
Synopsis of amendment history	Amended validation report R.1 included long-term stability assessment and update of tables, with additional assays performed to evaluate this.

Table 11: Summary Method Performance for the Determination of the Concentration of Tofersen in Human CSF (TS067-010VR-R.1)

Bioanalytical method validation report name, amendments, and hyperlinks	A Hybridization Assay for the determination of BIIB067 (Formerly ISIS 666853) in Human Cerebrospinal fluid (CSF) TS067-010VR-R.1		
Method description	Hybridization ELISA for the determination of tofersen in human CSF using a complementary cutting probe that was specific to the antisense oligonucleotide		
Materials used for standard calibration curve and concentration	Tofersen (formerly ISIS 666853) drug product in undiluted normal human plasma at concentrations ranging from 0.500 to 120 ng/mL Quantitative range: 1.00 to 100 ng/mL Accessory standards/anchor points: 0.500 and 120 ng/mL		
Validated assay range	1.00 to 100 ng/mL		
Material used for quality controls (QCs) and concentration	Tofersen (formerly ISIS 666853) drug product in undiluted normal human CSF at 1.00 ng/mL (ULOQ); 3.00 ng/mL (QC1); 30.0 ng/mL (QC2); 75.0 ng/mL (QC3); 100 ng/mL (ULOQ)		
Minimum required dilutions (MRDs)	The minimum dilution at which all individual samples demonstrate acceptable accuracy from multiple subsequent dilutions was assessed and implemented in the runs.		
Source and lot of reagents	Calibrators and QCs: Tofersen Bioanalytical Solution Standard (Lot [redacted]; Ionis Pharmaceuticals, Inc) Probe: ISIS 666853cutBIOTEG Probe (Lots [redacted], [redacted], [redacted] and [redacted]; Ionis Pharmaceuticals, Inc) Additional commercially available reagents are detailed in TS067-010VR-R.1.		
Regression model and weighting	Four-parameter logistic model with a weighting factor of $1/Y^2$		
Validation Parameters	Method Validation Summary		Source Location
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	Number of standard calibrators from LLOQ to ULOQ	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100.00 ng/mL	Table 8 of report TS067-010VR-R.1
	Cumulative accuracy (%RE) from LLOQ to ULOQ	-2.1% to 4.5%	Table 8 of report TS067-010VR-R.1
	Cumulative precision (%CV) from LLOQ to ULOQ	≤ 5.4%	Table 8 of report TS067-010VR-R.1
Performance of QCs during accuracy and precision runs	Cumulative accuracy (%RE) in 5 QCs		Table 10 of report TS067-010VR-R.1
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	1.6%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	-0.9%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	-4.9%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	-4.8%	

	(ULOQ) 100 ng/mL	-2.7%	
	Inter-batch %CV		Table 10 of report TS067-010VR-R.1
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	5.7%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	4.9%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	3.7%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	5.0%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	8.4%	
	Total error (TE)		Table 10 of report TS067-010VR-R.1
	(LLOQ) 1.00 ng/mL	7.3%	
	(QC1) 3.00 ng/mL	5.8%	
	(QC2) 30.0 ng/mL	8.6%	
	(QC3) 75.0 ng/mL	9.7%	
	(ULOQ) 100 ng/mL	11.1%	
Selectivity and matrix effect	10/10 blank normal CSF samples were < LLOQ. 100% (10/10) of individual donor lots of normal CSF recovered between 81.4% to 100.6% nominal at QC1 (3.00 ng/mL) and 83.3% to 103.4% nominal at QC3 (75.00 ng/mL)		Table 1 of report TS067-010VR-R.1
Interference and specificity	Metabolite Cross-reactivity and Interference 3 putative tofersen metabolites, ISIS 764434 (n-1 from 3'-end), ISIS 764435 (10-mer, 5' -end 10-mer), ISIS 764437 (n-15, 5' -end 5-mer), were spiked into human CSF samples at a theoretical concentration of 75.0 ng/mL. ISIS 764435 and ISIS 764437 did not cross-react (< LLOQ). ISIS 764434 cross-reacts with tofersen method to a minimal extent (2.11%) with CV 3.6%. Low (3.00 ng/mL) and high (75.0 ng/mL) tofersen samples were spiked with increasing concentrations of each of the putative metabolites. No metabolite interference was detected, as the accuracy of the mean concentrations was within ± 20% of the nominal values at each QC level.		Tables 2, 3, 4, and 5 of report TS067-010VR-R.1
Hemolysis effect	Not evaluated		N/A
Lipemic effect	Not evaluated		N/A

Dilution linearity and hook effect	100 µg/mL tofersen in human CSF diluted: 1000-fold: 93.2% recovery (9.9%CV) 4000-fold: 90.0% recovery (5.2%CV) 20,000-fold: 85.8% recovery (4.2%CV) No prozone observed at tofersen ≤ 100,000 ng/mL	Tables 6 and 7 of report TS067-010VR-R.1
Bench-top/process stability	Ambient temperature: stable for 22 h • QC1: %recovery = 90.7% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 91.1% (n = 6) 4ºC: stable for 22 h • QC1: %recovery = 91.0% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 94.5% (n = 6)	Table 12 and 13 of report TS067-010VR-R.1
Freeze-thaw stability	Freeze-thaw: stable for 5 cycles • QC1: %recovery = 100.6% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 92.6% (n = 6)	Table 11 of report TS067-010VR-R.1
Long-term storage	Long term at -20ºC: stable up to 368 days • QC1: %recovery = 91.7% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 96.7% (n = 6) Long term at -80ºC: stable up to 368 days • QC1: %recovery = 91.4% (n = 6) • DIL QC: %recovery = 98.1% (n = 6)	Table 19 and 22 of report TS067-010VR-R.1
Parallelism	Not evaluated	N/A
Carry over	Not evaluated	N/A
Method Performance in Study 101 TS067-011BR-R.1		
Assay passing rate	Passing rate for sample analysis runs: 88.5% (69 of 78 runs)	Table 1 of report TS067-011BR-R.1
Standard curve performance	• Cumulative % theoretical range: 99.0% to 104.0% • Cumulative precision: ≤ 5.2% CV	Table 3 of report TS067-011BR-R.1
QC performance	• Cumulative % theoretical range: 96.1% to 101.1% • Cumulative precision: ≤ 12.9% CV • TE: ≤ 13.2%	Table 4 of report TS067-011BR-R.1
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was performed and 87.5% of the samples met the prespecified criteria.	Table 7 of report TS067-011BR-R.1
Study sample analysis/ stability	All study samples were analyzed within the proven stability period (368 days stored in a freezer set to maintain -80°C), except for 19 samples (377-644 days).	Section 6.5 of report TS067-011BR-R.1

Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100 ng/mL	
Method Performance in Study 233AS102 TS067-014BR-IN.1		
Assay passing rate	Passing rate for sample analysis runs: 82.2% (106 of 129 runs)	Table 1 of report TS067-014BR-IN.1
Standard curve performance	• Cumulative % theoretical range: 98.6% to 103.5% • Cumulative precision: ≤ 6.6% CV	Table 3 of report TS067-014BR-IN.1
QC performance	• Cumulative % theoretical range: 97.4% to 102.8% • Cumulative precision: ≤ 16.8% CV • TE: ≤ 19.6%	Table 4 of report TS067-014BR-IN.1
Method reproducibility	Incurred sample reanalysis was not performed as this was done in Study 101.	NA
Study sample analysis/ stability	2527 study samples included in this interim report were analyzed within the proven stability period (368 days stored in a freezer set to maintain -80°C), except for 38 samples that were analyzed outside of the 368 days proven stability (372 to 1253 days). Extended stability evaluation is in progress.	Section 6.5 of report TS067-014BR-IN.1
Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100 ng/mL	
Method Performance in Study 233HV101 TS067-027BR		
Assay passing rate	80.0% (4 of 5 CSF sample analysis runs)	Table 1 of report TS067-027BR
Standard curve performance	• Cumulative % theoretical range: 95.3% to 106.1% • Cumulative precision: ≤ 13.6% CV	Table 4 of report TS067-027BR
QC performance	• Cumulative % theoretical range: 90.3% to 97.0% • Cumulative precision: ≤ 8.8% CV • TE: ≤ 16.7%	Table 6 of report TS067-027BR
Method reproducibility	No incurred sample reanalysis was performed for human CSF since the amount of the study samples is < 20.	NA
Study sample analysis/ stability	All human CSF samples were analyzed within the proven stability period of 368 days (refer to Table 22 of report TS067-010VR-R.1) in a freezer set to maintain - 80°C.	Section 6.5 of report TS067-027BR

Standard calibration curve performance during accuracy and precision runs	9 standard calibrators ranging from 1.00 to 100 ng/mL

Table 12: Summary of Qualification Results for the Determination of the Concentration of Tofersen in Brain Tissue

Method Summary		
Report number	666853-MV03 and 666853-MV03 Amendment 1 (Validation in Monkey Brain Tissue) TS067-016QR (Qualification in Human Brain Tissue)	
Analyte	Tofersen	
Matrix	Brain tissue	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Calibration range (monkey tissue) working range from 15.00 to 1200 ng/g	• Mean back-calculated concentration of at least 75% of the working standards are within 80% to 120% of their theoretical concentration (75% to 125% for LLOQ). • %CV between the duplicate instrument responses at each working standard level ≤ 20%.	• At least 8 out of 9 standards were within ± 20% of their theoretical concentration (± 25% for the LLOQ standard) and within 20% CV at each working standard.
Intra-assay precision and accuracy (human tissue) LLOQ (15.0 ng/g) QC1 (45.0 ng/g) QC2 (200 ng/g) QC3 (900 ng/g) ULOQ (1200 ng/g)	• %Theoretical ± 20% for all QC levels (or ± 25% for LLOQ) • %CV ≤ 20% at all QC levels • Total error (%) ≤ 30% at all QC levels (or ≤ 40% for LLOQ)	(n = 6) *Recovery* LLOQ: %T): 100.9%; %CV: 4.2% QC1: %T: 102.1%; %CV: 5.7% QC2: %T: 97.6%; %CV: 4.5% QC3: %T: 102.0%; %CV: 4.9% ULOQ: %T: 104.1%; %CV: 4.0% *Total error* LLOQ: 5.1% QC1: 7.8% QC2: 6.9% QC3: 6.9% ULOQ: 8.1%
Intra-assay precision and accuracy (monkey tissue) LLOQ (15.00 ng/g)	• Mean recovery (%) of at least 4 out of 6 QC replicate samples should be within 80% to 120% of their theoretical concentration (75% to 125% for LLOQ).	Brain (n = 6) *Recovery* LLOQ: T(%): 99.2%; %CV 10.0% QC1: T(%): 98.7%; %CV: 7.0% QC2: T(%): 89.4%; %CV: 4.0% QC3: T(%): 98.9%; %CV: 9.8%

QC1 (45.00 ng/g) QC2 (400.0 ng/g) QC3 (900 ng/g) ULOQ (1200 ng/g)	• %CV between concentrations should be ≤ 20% (≤ 25% for LLOQ). • Total error (%) ≤ 30% at all QC levels (or ≤ 40% for LLOQ)	ULOQ: T(%): 105.4%; %CV: 13.8% *Total error* LLOQ: 10.8% QC1: 8.3% QC2: 14.6% QC3: 10.9% ULOQ: 19.3% Spinal Cord (n = 6) *Recovery* LLOQ: T(%): 101.3%; %CV: 9.2% QC1: T(%): 93.1%; %CV: 13.1% QC2: T(%): 99.2%; %CV: 7.7% QC3: T(%): 109.0%; %CV: 14.5% ULOQ: T(%): 110.6%; %CV: 13.3% *Total error* LLOQ: 10.4% QC1: 20.0% QC2: 8.5% QC3: 23.5% ULOQ: 23.9%
Inter-assay precision and accuracy (monkey tissue) LLOQ (15.00 ng/g) QC1 (45.00 ng/g) QC2 (400.0 ng/g) QC3 (1200 ng/g)* ULOQ (1500 ng/g)*	• Mean recovery (%) of QC samples should be within 80% to 120% of their theoretical concentration (75% to 125% for LLOQ). • CV (%) between concentrations should be ≤ 20% (≤ 25% for LLOQ). • Total error for each QC level should not exceed 30% (40% at LLOQ).	Brain (n = 15) *Recovery* LLOQ: T(%): 106.5%; %CV: 16.5% QC1: T(%): 102.4%; %CV: 16.1% QC2: T(%): 97.5%; %CV: 15.4% QC3: T(%): 103.0%; %CV: 18.2% ULOQ: T(%): 114.2%; %CV: 16.9% *Total error* LLOQ: 23.0% QC1: 18.5% QC2: 17.9% QC3: 21.2% ULOQ: 31.0%* Spinal Cord (n = 15) *Recovery* LLOQ: T(%): 107.1%; %CV: 16.9% QC1: T(%): 100.5%; %CV: 14.7%

		QC2: T(%): 95.6%; %CV: 13.0% QC3: T(%): 106.8%; %CV: 9.7% ULOQ: T(%): 125.3%; %CV: 17.4% *Total error* LLOQ: 24.0% QC1: 15.2% QC2: 17.4% QC3: 16.6% ULOQ: 42.6% * = out of acceptance criteria
Prozone effect (monkey tissue) Highly concentrated stock: 200,000; 100,000; 40,000; 20,000; 4000; and 2000 ng/g Samples diluted within the range of the curve: 100.0 and 40.00 ng/g	• None observed if concentrations are > ULOQ in high-concentration stock solutions. • Samples diluted within the linear range of the curve should have recoveries ± 20% of their theoretical concentration and CV ≤ 20%.	• Concentrations > ULOQ in high-concentration stock solutions • Recoveries within 80% to 120% of their theoretical concentrations, with %CV ≤ 20% at each concentration for each tissue homogenate, except for Prozone-7 sample in the spinal cord homogenate, which had a recovery of 79.3%
Dilution linearity (monkey tissue) %recovery Highly concentrated stock (200,000 ng/g) was diluted at 3 dilutions (1/200, 1/1000, and 1/10000).	• %recovery of at least 4 out of 6 (67%) replicates of linearity samples at each concentration was within 80% to 120% of the theoretical concentration with %CV ≤ 20%. The accuracy of the mean value was within 80% to 120% of the theoretical concentration. • Accuracy of the mean value was within 80% to 120% of the theoretical	• %recovery of at least 4 out of 6 replicates of linearity samples at each concentration was within 80% to 120% of the theoretical concentration, with %CV ≤ 20% for the monkey brain tissue. • For Lin-01 (prepared at 200,000 ng/g diluted 200-fold) and Lin-02 (prepared at 200,000 ng/g diluted 1000-fold) samples in the spinal cord, only 3 out of 6 replicates were within 80% to 120% of the theoretical concentration.

	concentration.	
Selectivity (monkey tissue) Blank samples Spiked samples %recovery	• ≥ 80% of the samples without tofersen must be below the LLOQ. • At least 80% of tofersen spiked samples must have recoveries within 80% to 120% of the theoretical concentration.	• 100% (10/10 brain and 8/8 spinal cord) of the samples without tofersen were below the LLOQ. • 100% (10/10) brain sample spiked at 45.00 ng/g or 1200 ng/g recovered within 80% to 120% of the theoretical concentration. • 87.5% (7/8) spinal cord samples spiked at 1200 ng/g recovered within 80% to 120% of the theoretical concentration.
Metabolite cross-reactivity (monkey tissue) 900.0 ng/g ISIS 764434 (n-1 from 3'-end) ISIS 764435 (10-mer, 5' -end 10-mer) ISIS 764437 (n-15, 5' -end 5-mer)	%CV of the replicate determinations for each metabolite does not exceed 20% (no acceptance criteria were applied if the observed concentration was < LLOQ).	• ISIS 764434: ≤ 20% cross-reactivity • ISIS 764435: < 1.67% cross-reactivity) • ISIS 764437: < 1.67% cross-reactivity)
Metabolite interference (monkey tissue)	• There is no metabolite interference if accuracy of the mean concentrations is within ± 20% of the nominal values at each QC level. • %CV of the replicate determinations should not exceed 20% at each QC level.	A %recovery greater than +20% was obtained for a sample containing 45.00 ng/g of the parent drug and 11.25 ng/g of ISIS 764435 in the brain homogenate. A %CV greater than 20% was obtained for a sample a sample containing 900.0 ng/g of the parent drug and 45 ng/g of ISIS 764434 in the spinal cord homogenate. All other metabolite interference samples tested gave recoveries of ± 20% nominal concentration and CV ≤ 20%. Both failures appeared to be due to loading errors and not due to any interference from the metabolite.
Stability (monkey tissue)	• Mean recoveries of the stability samples must be	• 4ºC Brain: stable for 25 h 42 min

QC1 level: 45.00 ng/g DIL QC level: 200 µg/g diluted down to 400 ng/g on the day of the stability assessment	within ± 20% of theoretical concentrations • The %CV of the replicate determinations for the initial (Day 1) samples had to be ≤ 20%, and the mean concentration of the initial (Day l) samples had a soft target of ± 10% of the nominal concentration for the stability preparation to be acceptable for further stability evaluations.	- QC1: % theoretical = 102.8% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 94.3% (n = 6) Spinal cord: 73 h 18 min - QC1: % theoretical = 97.1% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 80.0% (n = 6) • Room temperature Brain: stable for 25 h 42 min - QC1: % theoretical = 103.2% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 100.7% (n = 6) Spinal Cord: stable for 25 h 42 min - QC1: % theoretical = 111.0% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 99.2% (n = 6) • Freeze-thaw Brain: stable for 5 cycles - QC1: % theoretical = 113.7% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 105.0% (n = 6) Spinal Cord: stable for 5 cycles - QC1: % theoretical = 106.9% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 99.7% (n = 6) • Long term at -80ºC Brain: stable up to 448 days - QC1: % theoretical = 102.3% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 98.9% (n = 6) Spinal Cord: stable up to 400 days - QC1: % theoretical = 91.6% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 79.9%* (n = 6) *Considered be with 20% of theoretical based on rounding.

		• Extracted and reconstituted samples at -80ºC Stable up to 35 days - QC1: % theoretical = 94.2% (n = 6) - DIL QC: % theoretical = 86.3% (n = 6)

Appendix B. Tofersen PD, Biomarker Immunogenicity Assays: Summary of Method Performance

Table 13: Summary of Fit-for-Purpose Validation Results for the Quantification of Cu/Zn SOD SOD1 in Human CSF (TS067-008VR)

Method Summary		
Report Number	TS067-008VR and TS067-008VR-A	
Analyte	SOD1	
Matrix	CSF	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Performance of standard calibrators and standard curves	• Within a run, > 75% of the standards, except anchor standards, should have a %CV of ≤ 20% (≤ 25% at LLOQ and ULOQ) and cumulative %bias of ≤ 20% (≤ 25% at LLOQ and ULOQ). • Both the cumulative absolute %bias mean and the cumulative %CV mean should be ≤ 15% for each standard calibrator (≤ 20% at the LLOQ), not including the anchor points.	• Observed concentrations for all 20 reported calibration curves for all 7 calibrators (100% of the standard points) were within ± 20% of the nominal concentration (± 25% at LLOQ) and met the targeted acceptance criteria. • Cumulative %bias of the back-calculated values of all standards were within ± 5.0% with a %CV of ≤ 6.2% using the 4-parameter logistic function with weighting.
Intra-assay precision and accuracy	• $\%CV_p$ ≤ 20.0% at all QC levels (≤ 25.0% at the LLOQ and ULOQ) • %RE (bias) ≤ 20.0% at all QC levels (≤ 25.0% at the LLOQ and ULOQ)	Precision • $\%CV_p$ 10.3% to 14.6% at all QC levels • % RE range -9.8% to 19.6% at all QC levels (excluding LLOQ outlier values)
Interassay precision and accuracy	• %RE (bias) ≤ 20.0% at all QC levels (≤ 25.0% at the LLOQ and ULOQ) • $\%CV_t$ ≤ 20.0% at all QC levels (≤ 25.0% at the LLOQ and ULOQ) • Total error within ± 30% (± 40% for LLOQ)	• %RE -1.9% to 11.0% for all QC levels • $\%CV_t$ 10.9% to 15.6% at all QC levels • %Total error 12.4% to 26.6% for all QC levels (excluding LLOQ outlier values)

Parallelism and matrix response	• 80% of diluted human CSF samples falling between LLOQ and ULOQ must be within ± 30% of their assigned concentration. • %CV of cumulative back-calculated ≤ 25.0%	• 100% (10/10) of samples diluted within the assay range (up to 1:800) were within ± 30% of their assigned concentration. • Back-calculated concentration yielded cumulative precision ranging from 4.4% to 18.8%.
Stability	Measured concentrations of the Cu/Zn SOD in at least 2 out of 3 aliquots (≥ 67%) of the stability samples must be within ± 30% of their assigned nominal concentration with CV ≤ 30%.	• The measured concentrations of the analyte in all 3 aliquots (100%) of the stability samples at each level fell within 30% of the assigned nominal concentration. • Freeze-thaw: stable for 6 cycles in human CSF (%RE was 3.1% and %CV was 10.9%). • Room temperature: up to 28 h and 25 min in human CSF (%RE was to -2.8% and %CV was 2.4% to 4.4%). • Refrigerator (2° to 8ºC): 27 h and 22 min in human CSF (%RE was -13.8% and %CV was 1.6%). • Long term: stable up to 1126 days at -20°C and -70°C in human CSF (%RE was -4.3% and %CV was 7.5%).
Ruggedness and robustness	• Capacity of assay to remain unaffected by small variations in method parameters	• Acceptable performance of the accuracy and precision runs indicated that the analytical procedure was sufficiently robust for normal usage.

Table 14: Summary of Validation for the Detection of Anti-BIIB067 IgG and IgM Antibodies in Human Plasma (TS067-018VR)

Method Summary		
Report Number	TS067-018VR	
Analyte	Anti-tofersen antibodies	
Matrix	Plasma	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Screening, confirmation, and titration assay cut-points	No acceptance criteria. 60 individual human plasma samples (both normal and disease) with no prior exposure to the drug were tested in order to determine a statistically based assay cut-point value. Samples were analyzed at the MRD of 1:25 in the absence and presence of tofersen 50 µg/mL in 3 runs performed by 2 analysts.	Screening assay cut-point factor 1.7342 CCP factor 24.2630%

Intra-assay and interassay precision (screening)	• The mean absorbance value of positive controls on each occasion, should be ≥ PSCP value. The HPC group mean absorbance should be ≥ LPC group mean A450 nm ≥ LLPC group mean absorbance on all runs. • For the intra-assay precision to be acceptable, the %CV should be ≤ 20% for at least 80% of the occasions at each PC level. • For the interassay precision to be acceptable, the %CV of the mean % signal inhibition of intra-assay means at all levels for all the assays should be ≤ 20%. • Inter-assay precision of the PCs and NCs over all validation assays run was calculated for information purposes only.	• Mean absorbance values of HPC and LLPC were ≥ PSCP for all occasions. The %CV was ≤ 20% for PC samples at each level. • The HPC group mean absorbance was ≥ LLPC. group mean absorbance on all runs. • Interassay precision: %CV was ≤ 20% at each PC level. • The overall interassay precision at the LPC, LLPC, and HPC levels was 15.1%, 21.5%, and 2.4%, respectively. • The failure rate was 7.0% (3/43 assays).

Intra-assay and interassay precision (confirmatory)	• The mean % signal inhibition of positive controls on each occasion, should be ≥ CCP value. • For the intra-assay precision to be acceptable, the coefficient of variation should be ≤ 20% for at least 80% of the occasions at each PC level. • For the interassay precision to be acceptable, the %CV of the mean % signal inhibition of intra-assay means at all levels for all the assays should be 20%. • Interassay precision of the confirmatory PCs and NC over all validation assays was calculated for information purposes only.	• The mean % signal inhibition of positive controls, on each occasion, was ≥ CCP. • For each intra-assay precision, the coefficient of variation was ≤ 20% at each PC level. • For the interassay precision, the %CV of the mean % signal inhibition of intra-assay means at all levels for all the assays was ≤ 20%. • For the interassay precision calculated using all validation assays, the %CV of the mean % inhibition was ≤ 20% at the LLPC, LPC, and HPC levels but was > 20% (75.0%) at the NC level. All % signal inhibitions obtained for the NC were ≤ CCP except for Val-30; refer to Section 11, TS067-018VR.

Selectivity and matrix interference	Performed by analyzing 10 individual lots of normal human serum samples and 10 individual lots of disease state plasma with and without 160 ng/mL (LLPC level) and 20,000 ng/mL (HPC level) anti-tofersen antibodies. • At least 80% of the unspiked normal human plasma lots and at least 80% of the disease state human plasma should screen and confirm negative. • At least 80% of the individual lots of plasma prepared at each PC level should screen and confirm positive.	• 80.0% (8/10) of the unspiked normal human plasma lots and 9 out of 10 (90.0%) of the disease state human plasma were negative in the screening assay. • 100.0% (10/10) of the normal human plasma lots and 80.0% (8/10) of the disease state human plasma tested in the confirmatory assay were negative. • 100% (20/20) of the individual lots of plasma prepared at each PC level were positive in the screening and confirmatory assays.
Drug tolerance	LLPC and HPC (160 and 20,000 ng/mL, respectively) were pre-incubated in the presence of tofersen at different concentrations (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 µg/mL). The drug tolerance is expressed by reporting the highest concentration of tofersen resulting in a positive control concentration greater than or equal to the plate cut-point.	• At the LLPC level, the assay tolerated 0.5 µg/mL of tofersen. • At the HPC level, the assay tolerated up to 4.0 µg/mL of tofersen, which was the highest concentration tested. • During sample analysis, for correlation with the PK data, the drug tolerance of the method will be considered to be 0.5 µg/mL.

Sensitivity	Two-fold serial dilutions of the PC were made in pooled normal plasma with and without tofersen (50 µg/mL) on a total of 6 occasions performed by 2 analysts. Screening sensitivity = mean PC concentration at PSCP + ($t_{0.05,df}$ × SD). If N = 6, $t_{0.05,df}$ = 2.015. Confirmatory sensitivity = the mean of the lowest PC concentration with % signal inhibition above the CCP in each sensitivity run.	• Screening assay sensitivity was defined as 121.64 ng/mL in neat human plasma. • Confirmatory assay sensitivity was defined as 78.13 ng/mL in neat human plasma.

Specificity	Screening • The assay response obtained with another ASO antibody (anti-BIIB078 ASO PC) relative to the PSCP was used to evaluate the ability of the method to detect antibodies that bind specifically to tofersen and not to unrelated ASOs. Confirmation • Competition with tofersen (50 µg/mL) should generate a reduction (% signal inhibition) ≥ CCP at LLPC and HPC level. • The inhibition with a related ASO (BIIB078) was used to evaluate epitope specificity, and no acceptance criteria were applied.	Screening • Anti-BIIB078 generated a signal > PSCP between 20,000 ng/mL and 9.8 ng/mL, supporting the hypothesis that ADAs detected with this method may not be BIIB067-epitope specific but rather ASO-backbone specific. Confirmation • BIIB067 generated a reduction (% signal inhibition) ≥ CCP at each PC level. • BIIB078 generated a reduction (% signal inhibition) ≥ CCP at the LLPC level but < CCP at the HPC level. The specificity of the method was suspected to be not epitope specific but related to the backbone of the ASO.

Precision of titers	• Titration samples were analyzed at least n = 1 on 3 occasions (interassay precision) and n = 3 on 1 occasion (intra-assay precision). The target titer was estimated as a median titer from all determinations on all plates. • Interassay precision of titers was determined by comparing all individual titer determinations to the target titer. • 80% of total interassay titer determinations should be within 1 dilution of the target titer in the PC titration series. All titration series should reach the titration cut-point.	• The target titer was determined as 6400. • For all intra- and interassay precision, all titer determinations were within 1 titer dilution of the target titer (ranged from 6400 and 12,800).
Prozone effect	Positive control (anti-tofersen antibody) spiked into human plasma at 10 times HPC was diluted using nineteen 2-fold serial dilutions. Mean Prozone PC sample (MRD) should screen positive (mean absorbance value ≥ PSCP).	Prozone PC sample (MRD) screened positive (≥ PSCP). A slight prozone effect, however, within the assay's variability was observed in the PC range tested.
Stability	Stability was considered acceptable if at least 2 out of 3 replicates at each PC level were within the acceptable control ranges.	Room temperature: up to 50 h 45 min • 3 out of 3 HPC and 3 out of 3 LLPC were within their respective acceptable ranges. Freeze-thaw: up to 7 freeze-thaw cycles • 2 out of 3 HPC and 3 out of 3 LLPC were within their respective acceptable ranges.

Robustness	Robustness is considered acceptable if the signal of the NC and PC samples is within the acceptance criteria under relevant real-life changes in standard laboratory conditions, which included changes in incubation times at the various steps.	The signals obtained for the NC and PC samples were within their respective acceptable ranges and met the assay acceptance criteria when assays were run at minimum and maximum allowable incubation durations.

Table 15: Summary of Fit-for-Purpose Qualification Results for the Quantification of pNfH in Human Plasma at Biogen (TS033-107QR)

Method Summary		
Report Number	TS033-107QR	
Analyte	pNfH	
Matrix	Plasma	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Intra-assay precision	Intra-assay precision ($\%CV_p$) for QCs and EQCs should be ≤ 30%.	LLOQ-B $\%CV_p$ = 12.0 LLOQ-A $\%CV_p$ = 5.9 Low QC $\%CV_p$ = 4.8 Medium QC $\%CV_p$ = 2.8 High QC $\%CV_p$ = 4.1 ULOQ $\%CV_p$ = 5.5 EQC plasma $\%CV_p$ = 5.7
Interassay precision	The intermediate precision ($\%CV_t$) for EQC and QCs (in the precision runs only) should be ≤ 30%.	LLOQ-B $\%CV_t$ = 18.6 LLOQ-A $\%CV_t$ = 7.8 Low QC $\%CV_t$ = 9.1 Medium QC $\%CV_t$ = 8.3 High QC $\%CV_t$ = 11.6 ULOQ $\%CV_t$ = 10.8 EQC plasma $\%CV_t$ = 15.1
Accuracy	Mean accuracy (%RE) for QCs should be within < 30% each run.	Low QC %RE = 28.2 Medium QC %RE = 9.8 High QC %RE = 2.2
EQC range	Acceptable control range for sample testing is determined as 3 × SD_t from acceptable qualification runs.	EQC plasma range = 508.64 to 191.20 pg/mL
Parallelism	At least 2 dilution-adjusted concentrations from serial diluted human plasma samples should have %recovery ± 30% of the assigned nominal concentration for values within the reportable range.	9 out of 10 samples reported at least 3 concentrations in the acceptable assay range. Overall, 18 out of 20 samples (90%) were parallel across all 5 dilutions. No interference was observed at the lowest MRD (1:2), suggesting a sample LLOQ of 14.94 pg/mL at the 1:2 MRD.

Stability	Stability is acceptable if the measured concentrations of the analyte in samples meet the following criterion: %CV ± 30%.	Room temperature: 12 h Refrigerator (4ºC): 12 h Freeze-thaw: up to 4 freeze-thaw cycles
Robustness	%CV of the mean calculated result of each QC and EQC across all parameters should be ≤ 30%.	Using 2 analyzers and 2 lots of reagent kits, the %recovery of QCs and EQC were in the range of 100 ± 30%.

Table 16: Summary of Fit-for-Purpose Qualification Results for the Quantification of pNfH in Human Plasma at [redacted] (CJQ [redacted]-382-VR01)

Method Summary		
Report Number	CJQ-[redacted]-382-VR01	
Analyte	pNfH	
Matrix	Plasma	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Intra-assay precision	Intra-assay precision ($\%CV_p$) for each QC and EQC should be ≤ 20%.	HQC2: CV_p = 7.5% HQC: CV_p = 5.6% LQC: CV_p = 10.8% hEQCp: CV_p = 7.1% mEQCp: CV_p = 3.5% lEQCp: CV_p = 8.3%
Interassay precision	Interassay precision ($\%CV_t$) for each QC and EQC should be ≤ 20%.	HQC2: CV_t = 9.6% HQC: CV_t = 10.1% LQC: CV_t = 15.3% hEQCp: CV_t = 8.3% mEQCp: CV_t = 4.1% lEQCp: CV_t = 8.5%
Relative accuracy	Observed assay performance is to be assessed against context of use to determine suitability.	Mean intra-assay %RE: HQC2: 4.7% HQC: 6.6% LQC: 9.2% hEQCp: 4.0% mEQCp: 1.8% lEQCp: 2.3%
Total error (%CV + %RE)	Total error will be reported as average intra-assay %RE + interassay %CV.	Total error: HQC2: 14.2% HQC: 16.7% LQC: 24.5% hEQCp: 12.3% mEQCp: 6.0% lEQCp: 10.8%

Table 17: Summary of Fit-for-Purpose Qualification Results for the Quantification of pNfH in Human CSF at Biogen (TS033-107QR-1)

Method Summary		
Report Number	TS033-107QR-A	
Analyte	pNfH	
Matrix	CSF	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Intra-assay precision	Intra-assay precision ($\%CV_p$) for each CSF EQC should be ≤ 30%.	EQC ALS CSF (HMN13814) $\%CV_p$ = 5.01 EQC ALS CSF (HMN13815) $\%CV_p$ = 6.07
EQC range	Acceptable control range for sample testing determined as 3 × SD_t from acceptable qualification runs.	EQC ALS CSF (HMN13814) Range = 10234.88 to 1537.74 pg/mL EQC ALS CSF (HMN13815) Range = 9333.79 to 1699.22 pg/mL
Parallelism	At least 2 dilution-adjusted concentrations from serial diluted human CSF samples should have %recovery ± 30% of the assigned nominal concentration for values within the reportable range.	• In both ALS CSF samples tested, all 5 concentrations were within the acceptable assay range and were parallel across all dilutions (10/10). • These data also show no interference at the lowest MRD (1:4), confirming that the MRD suggested by ProteinSimple for CSF is acceptable.
Stability	Stability is acceptable if the measured concentrations of the analyte in samples meet the following criterion: %CV ± 30%.	Room temperature: 12 h Refrigerator (4ºC): 12 h Freeze-thaw: up to 4 freeze-thaw cycles

Table 18: Summary of Fit-for-Purpose Qualification Results for the Quantification of pNfH in Human CSF at [redacted] (CJQ-[redacted]-376-VR01)

Method Summary		
Report Number	CJQ-[redacted]-376-VR01	
Analyte	pNfH	
Matrix	CSF	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Intra-assay precision	Intra-assay precision (%CVp) for each QC and EQC should be ≤ 20%.	HQC2: CV_p = 6.4% HQC: CV_p = 5.1% LQC: CV_p = 7.6% hEQCs: CV_p = 4.1% mEQCs: CV_p = 5.9% lEQCs: CV_p = 11.6% (25.9% including outlier in run 6)
Interassay precision	Interassay precision (%CV_t) for each QC and EQC should be ≤ 20%.	HQC2: CV_t = 6.9% HQC: CV_t = 6.9% LQC: CV_t = 11.8% hEQC: CV_t = 4.2% mEQC: CV_t = 7.8% lEQC: CV_t = 17.7% (57.5% including outlier in run 6)
Relative accuracy	Observed assay performance to be assessed against context of use to determine suitability.	Mean intra-assay %RE: HQC2: 2.6% HQC: 3.9% LQC: 8.4% hEQC: 1.2% mEQC: 4.7% lEQC: 8.6% (16.5% including outlier in run 6)
Total error (%CV + %RE)	Total error will be reported as average intra-assay %RE + interassay %CV.	Total error: HQC2: 9.5% HQC: 10.7% LQC: 20.2% hEQC: 5.4% mEQC: 12.5% lEQC: 26.4% (74% including outlier in run 6)

Table 19: Summary of Fit-for-Purpose Qualification Results for the Quantification of NfL in Human Plasma and CSF at [redacted] (TS067 037QR)

Method Summary		
Report Number	TS067037-QR	
Analyte	NfL	
Matrix	Plasma and CSF	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Assessment of plate calibrators	• 75% of calibration points within acceptance criteria to pass run. • Backfit %CV ≤ 25%. Backfit concentrations within ± 30% of nominal. • Mean AEB from Calibrator A must be lower than Calibrator B.	All calibration curves had at least 75% of standards meet acceptance criteria
Assessment of plate controls	• 70% of controls must meet acceptance criteria to pass run. • Concentration %CV ≤ 25%, minimum of 1 QC accepted per level. • Controls within range (± 30% of nominal for spiked QCs; within average ± 3SD for EQCs).	All plates met acceptance criteria except for 1 plate for which EQC1 and LQC were above established ranges.
Accuracy and precision (interplate)	• Overall average levels for QCs should be within ± 30% of nominal spike. • Average EQCs should be within established control ranges. • Overall average %CV ≤ 25% per control level.	Average QCs and EQCs concentrations were within acceptable control ranges. %CVs were all below 12%.
Accuracy and precision (intraplate)	• Precision per plate should be ≤ 25% per control level. • Average control levels per plate should be within established control ranges.	Averages calculated QCs and EQCs concentrations per level and plate were within acceptable control ranges.

		%CVs were all ≤ 17%.
Sensitivity	Both intra-assay and interassay precision should be ≤ 25% at ULOQ and ≤ 30% at LLOQ.	Intra-assay precision was below 16% for both LLOQ and ULOQ. Interassay precision was below 13% for LLOQ and ULOQ.
Parallelism	• 3 dilutions per sample must be within assay range. • %CV ≤ 25% between replicates. • Results must be within ± 30% of baseline. • At least 8 out of 10 HV samples and 4 out of 5 ALS samples must meet acceptance criteria for parallelism assessment to pass.	9 out of 10 HV plasma samples and 4 out of 5 ALS plasma samples met acceptance at 4-fold MRD. 9 out of 10 HV CSF samples and 5 out of 5 ALS CSF samples met acceptance at both 50-fold and 100-fold MRD.
Stability	%CV ≤ 25% between replicates. Measured concentrations within ± 30% of freshly thawed sample results.	4ºC: overnight • 3 out of 3 plasma samples met acceptance criteria. Recovery range 84% to 98%. • 2 out of 3 CSF samples met acceptance criteria. Recovery range 61% to 126%. Room temperature for 4 h: • 3 out of 3 plasma samples met acceptance criteria. Recovery range 83% to 95%. • 2 out of 3 CSF samples met acceptance criteria. Recovery range 67% to 108%. Freeze-thaw: up to 3 cycles • 3 out of 3 plasma samples met acceptance criteria.

		Recovery range 87% to 108%. • 1 out of 3 CSF samples met acceptance criteria. Recovery range 63% to 93%.
Robustness	Calibration curve and controls from 2 plates from 2 different lots of NfL kits must meet the following criteria: • Backfit %CV ≤ 25%. • Backfit concentrations within ± 30% of nominal. • Mean AEB from Calibrator A must be lower than Calibrator B. • Concentration %CV ≤ 25%, minimum of 1 QC accepted per level. • Controls within range (± 30% of nominal for spiked QCs; within average ± 3SD for EQCs).	All calibration curves met acceptance criteria. 90% of controls (and at least 1 control per level per plate) met acceptance criteria.
Drug interference	Five CSF samples were spiked with tofersen at 0, 2.5, 5, and 50 μg/mL and then diluted at MRD and run-in assay: • Plate must meet acceptance standards for all calibration standards and controls and samples • Sample must have %CVs ≤ 25% for all values within range of curve • Report %recovery results	Standards and controls met acceptance criteria. 90% of samples had %CV less than 25%. 13 out of 15 samples spiked with drug at different concentrations had acceptable recovery, ranging from 72% to 94%.

Table 20: Summary of Validation Results for the Quantification of NfL in Human Plasma at [redacted] (TS067-038VR)

Method Summary		
Report Number	TS067-038VR	
Analyte	NfL	
Matrix	EDTA Plasma	
Validation Summary		
Parameter	Acceptance Criteria	Results
Reportable range	• Analytes should be linear within the range tested with acceptable reproducibility (total %CV ≤ 20%). • The LLOQ is 4.9 pg/mL.	Assay range was 4.9 to 477 pg/mL.
Reproducibility	• Total %CV ≤ 20%	Within the assay range, total %CVs observed were 7.7% to 18.1%.
Sensitivity	Tested using plasma panel consisting of 10 samples (2 to 600 pg/mL) and 1 blank. • The LoD must be greater than the value determined for the LoB. • The LoD will be the mean LoD obtained from the 2 reagent/calibrator combinations. • The LLOQ was the lowest mean lowest concentration that could be reliably detected with acceptable linearity, accuracy, and precision. It must be greater than the LoD.	LoB = $mean_{blank}$ + 1.645 (SD_{blank}) = 0.58 pg/mL LoD = LoB + 1.645 ($SD_{low\ concentration\ samples}$) = 1.71 pg/mL LLOQ = 4.93 pg/mL
Linearity	• Linearity is established if $R^2 \geq 0.95$.	R^2 for the plasma NfL assay range of 4.9 to 477 pg/mL was determined to be 0.997.

Accuracy	• There is no gold standard for NfL quantification, so results were reported for informational purposes only.	• In comparison to the expected concentrations, the % difference for the plasma NfL samples within the assay range was between 13.0% and 40.2%. The average % difference for all panel members was 28.4%.
Drug interference	Tested using a panel of 24 common over-the-counter drugs and drugs used to treat Alzheimer's disease and multiple sclerosis. • Noninterference, defined as the %recovery ≥ 80% and ≤ 120%	• Interference was observed in the presence of > 0.0113 mg/dL mitoxantrone. • No interference was observed in the presence of the other drugs tested.
Tofersen interference Note that tofersen interference was not tested in plasma. Data available in report BKY-RPT-0110.	Tested using 7.60 µg tofersen (3x C_{max}) spiked into 3 serum pools. • Noninterference defined as NfL %recovery in tofersen-spiked samples between 80% to 120% of non-tofersen spiked samples	• NfL %recovery in tofersen-spiked samples was 102.97% of unspiked samples, indicating accuracy of NfL results was not affected by the presence of tofersen.
Stability	%recovery of the stability samples should be within 80% to 120%.	Freeze-thaw: up to 6 cycles • Average plasma sample %recovery was 92.0%. Room temperature: up to 1 week • Average plasma %recovery was 92.1%. 4ºC: up to 2 weeks • Average plasma %recovery was 88.2%. -20ºC: 1 months • Average plasma %recovery

		was 100.4%. -60ºC: 6 months • Average plasma %recovery was 96.3%.

トフェルセン

第 2 部 CTD の概要

2.7 臨床概要

2.7.2 臨床薬理の概要

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 5
1 背景及び概観 8
1.1 臨床薬理試験の概要 8
1.1.1 完了した試験 9
1.1.1.1 233AS101 試験 9
1.1.1.2 233HV101 試験 9
1.1.2 実施中の試験 10
1.1.2.1 233AS102 試験 10
1.2 治験薬投与 10
1.3 解析方法及び解析 11
1.4 薬物動態 11
1.5 薬力学 13
1.5.1 CSF 中総 SOD1 13
1.5.2 脱アミド化 SOD1 14
1.5.3 ニューロフィラメント 14
1.6 免疫原性の結果の概要 17
1.7 トフェルセン／薬物相互作用の可能性 18
2 個々の試験結果の要約 19
2.1 SOD1 変異を有する ALS 患者における薬物動態及び薬力学 25
2.1.1 233AS101 試験 － パート A 25
2.1.1.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果 25
2.1.1.2 血漿中トフェルセンの薬物動態の結果 27
2.1.1.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質 31
2.1.1.4 ニューロフィラメント 31
2.1.1.5 免疫原性の結果 31
2.1.2 233AS101 試験 － パート B 31
2.1.2.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果 31
2.1.2.2 血漿中トフェルセンの薬物動態の結果 34
2.1.2.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質 39
2.1.2.4 ニューロフィラメント 41
2.1.2.5 免疫原性の結果 43
2.1.3 233AS101 試験 － パート C 43
2.1.3.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果 44
2.1.3.2 血漿中トフェルセンの薬物動態の結果 49
2.1.3.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質 55
2.1.3.4 脱アミド化 SOD1 58
2.1.3.5 ニューロフィラメント 58
2.1.3.5.1 ニューロフィラメントのマトリックス（CSF及び血漿）とアイソ

フォーム（NfL 及び pNfH）との関係 63
2.1.3.5.2 統計的モデルに基づく NfL と臨床機能／生存との関係 66
2.1.3.6 免疫原性の結果 72
2.1.4 233AS102 試験の結果 72
2.1.4.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態 72
2.1.4.2 血漿中トフェルセンの薬物動態 75
2.1.4.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質 77
2.1.4.4 ニューロフィラメント 78
2.1.4.5 死亡したトフェルセン投与被験者の剖検試料による薬物動態解析 81
2.1.4.6 免疫原性 87
2.1.5 233HV101 試験の結果 88
2.1.5.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果 88
2.1.5.2 血清中トフェルセンの薬物動態の結果 88
2.1.5.3 薬力学の結果 90
2.1.5.4 分布 90
3 全試験を通しての結果の比較と解析 93
3.1 統合薬物動態解析 93
3.2 トフェルセンの母集団薬物動態 103
3.3 トフェルセンの薬物動態特性 103
3.4 トフェルセンの薬力学 104
3.4.1 CSF 中総 SOD1 タンパク質 104
3.4.2 ニューロフィラメント 112
3.4.3 追加のデータカット（2023 年 2 月）での薬力学の結果 120
3.4.3.1 背景と外観 120
3.4.3.2 CSF 中総 SOD1 タンパク質 120
3.4.3.3 血漿中及び CSF 中ニューロフィラメント軽鎖 127
3.4.3.4 結論 135
3.5 曝露－反応解析 135
3.5.1 目的 135
3.5.2 母集団 PK モデリング 135
3.5.3 母集団 PK－SOD1 反応モデル 138
3.5.4 母集団 PK－NfL 反応モデル 141
3.5.5 トフェルセンの母集団 PK 及び PK/PD モデリングから得られる全般的な結論 144
3.5.6 QTc 分析 144
3.6 薬物動態に影響を及ぼす要因及び特殊な集団 147
3.6.1 内因性要因の影響 147
3.6.1.1 体重 147
3.6.1.2 年齢（小児／高齢者） 148
3.6.1.3 性別 148
3.6.1.4 人種 148

3.6.1.5 肝機能及び腎機能障害 148
3.6.2 薬物相互作用の可能性 149
3.7 用法・用量の選択の薬物動態・薬力学的裏付け 150
3.8 免疫原性 151
4 結論 153
5 参考文献 155
6 付録 161

略語・略号一覧表

注：以下に示す略語・略号及びその定義は、本書初出時に使用するものとみなす。本書で使用する略語・略号については、本一覧表を参照のこと。

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
101 試験パート A	Study 233AS101 Part A SAD	233AS101 試験パート A　単回投与用量漸増試験
101 試験パート B	Study 233AS101 Part B MAD	233AS101 試験パート B　反復投与用量漸増試験
101 試験パート C	Study 233AS101 Part C Phase 3	233AS101 試験パート C　第 III 相臨床試験
102 試験	Study 233AS102 long-term extension	233AS102 試験　長期継続試験
2′-MOE	2′-O-(2-methoxyethyl)	2’-O-（2-メトキシエチル）
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADR	adverse drug reaction	－
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	筋萎縮性側索硬化症
ALSAQ-5	ALS Assessment Questionnaire	筋萎縮性側索硬化症評価質問票
ALSFRS-R	Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale – Revised	筋萎縮性側索硬化症機能評価尺度改訂版
ANCOVA	analysis of covariance	共分散分析
ASO	antisense oligonucleotide	アンチセンスオリゴヌクレオチド
AUC	area under the concentration-time curve	濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-t}	area under the concentration-time curve from time 0 to time *t*	投与後 0 時間から *t* 時間までの濃度―時間曲線下面積
BLQ	below the limit of quantitation	定量下限未満
BSA	body surface area	体表面積
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	－
CI	confidence interval	信頼区間
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	maximum observed serum/plasma concentration	最高血清／血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
Corr	correlation	相関
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
CSR	clinical study report	治験総括報告書
CT	computed tomography	コンピュータ断層撮影
CV	coefficient of variation	変動係数
CYP450	cytochrome P450	チトクローム P450 酵素
EC_{50}	half maximal effective concentration	50%有効濃度
E_{max}	maximum magnitude of effect in an effect model	効果モデルにおける最大効果
EQ-5D-5L	EuroQol 5 Dimension, 5 Level Questionnaire	－
GCP	Good Clinical Practice	医薬品の臨床試験の実施に関する基準
GMR	geometric mean ratio	幾何平均比
HHD	handheld dynamometry	ハンドヘルドダイナモメーター測定

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
IIV	interindividual variability	被験者間変動
ISE	integrated summary of efficacy	－
ISS	integrated summary of safety	－
IT	intrathecal	髄腔内
ITT	intention-to-treat	－
KA	rate constant of absorption (absorption rate from CSF to plasma)	吸収速度定数（CSF から血漿への吸収速度）
K_{out}	degradation rate	分解速度
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
MAD	multiple ascending dose	反復投与用量漸増
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities	医薬品規制調和国際会議国際医薬用語集
MI	multiple imputation	多重補完
mITT	modified intent-to-treat	－
MMRM	mixed model for repeated measures	反復測定値の混合効果モデル
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
NfH	neurofilament heavy	ニューロフィラメント重鎖
NfL	neurofilament light	ニューロフィラメント軽鎖
NfM	neurofilament medium	ニューロフィラメント中鎖
non-mITT	non-modified intent-to-treat	－
PBPK	physiologically-based PK	生理学的薬物速度論
pcVPC	prediction corrected visual predictive check	予測補正後の視覚的事後予測性能評価
PD	pharmacodynamic(s)	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
pNfH	phosphorylated neurofilament heavy chain	リン酸化ニューロフィラメント重鎖
pooled group CL	pooled group from Study 101 Part C and Study 102	101 試験パート C 及び 102 試験をプールした群
PV	permanent ventilation	永続的換気
Q	inter-compartmental clearance	コンパートメント間クリアランス
QoL	quality of life	生活の質
QTc	corrected QT interval	補正 QT 間隔
QTcF	corrected QT interval according to the Fridericia formula	Fridericia の補正式による補正 QT 間隔
RSE	relative standard error	相対標準誤差
SAD	single ascending dose	単回投与用量漸増
SAP	Statistical Analysis Plan	統計解析計画書
SD	standard deviation	標準偏差
SE	standard error	標準誤差
SMA	spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
SMQ	standardized MedDRA Query	標準検索式
SOD1	superoxide dismutase-1	スーパーオキサイドジスムターゼ 1
SOD1-ALS	ALS associated with a mutation in the SOD1 gene	SOD1 変異を伴う筋萎縮性側索硬化症
SPECT	single photon emission computed tomography	単光子放射型コンピュータ断層撮影
SVC	slow vital capacity	静的肺活量
$t_{1/2}$	half-life	半減期

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
T_{max}	time to reach maximum observed concentration	最高濃度到達時間
V2	central volume of distribution	中心コンパートメントの分布容積
V3	peripheral volume of distribution	末梢コンパートメントの分布容積

1 背景及び概観

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、皮質、脳幹、及び脊髄内の上位及び下位運動ニューロンが失われる、生命を脅かす重篤な疾患である［Wagner 2016; Wijesekera and Leigh 2009］。スーパーオキサイドジスムターゼ 1（SOD1）変異を伴う ALS は、ALS 患者全体の約 2%を占めると推定されており、これには既知の家族歴を有する患者及び家族歴のない患者が含まれる［Byrne 2011; Ranganathan 2020; Shepheard 2021; Zou 2017］。SOD1 の変異が ALS で変性を引き起こすメカニズムは十分に解明されていないが、SOD1 遺伝子における変異が異常機能獲得メカニズムを介して有害なタンパク質の蓄積を引き起こすと考えられている。この神経毒性は様々な一次性の原因から生じ、いずれも SOD1 タンパク質を凝集しやすくする［Allen 2003; Andersen 1995; Bruijn 1998; Ekhtiari Bidhendi 2018; Ilieva 2009; McCampbell 2018; Saccon 2013; Sau 2007］。

トフェルセン（BIIB067）は、*SOD1* 遺伝子に変異を伴う ALS の治療のために開発された修飾 2′-O-（2-メトキシエチル［2 ′-MOE］）アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）であり、髄腔内（IT）投与される。トフェルセンはヒト SOD1 タンパク質のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）の 3’非翻訳領域の一部と相補的であり、Watson-Crick 塩基対形成によって結合する（ハイブリダイゼーション）。同種 mRNA に対するトフェルセンのこのハイブリダイゼーションの結果、SOD1 タンパク質の mRNA はリボヌクレアーゼ H を介して分解されて、SOD1 タンパク質の合成量と蓄積量が減少する。タンパク質翻訳は、SOD1-ALS において考えられるすべての病理学的機序（これらはいずれも翻訳後の段階で生じる）の上流の事象であり、トフェルセンはこのタンパク質翻訳のための基質の量を抑制することから、すべての SOD1-ALS 患者にとって治療的ベネフィットが期待される。さらに、トフェルセンを投与すると血漿中ニューロフィラメント軽鎖（NfL）が低下する。血漿中 NfL は ALS の疾患進行速度と相関し、生存及び長期的な機能低下の予後因子である（1.5.3 項）。

1.1 臨床薬理試験の概要

トフェルセンの臨床開発プログラムには、完了した 2 つの試験（233AS101 試験［101 試験；パート A、パート B、パート C］、233HV101 試験）及び実施中の 2 つの試験（233AS102 試験［102 試験］、233AS303 試験）が含まれている。臨床開発プログラム全体で、健康被験者 8 例及び ALS 患者 166 例（162 例は SOD1 変異を有する ALS 患者）にトフェルセンが投与された。欧州、北米、及び日本において登録された被験者のトフェルセン投与開始時の年齢は、21～78 歳であった。

本概要に示した臨床薬理データは、101 試験パート A、B、及び C（最終データ）、102 試験（2 回の中間解析：データカット日は 2021 年 7 月 16 日及び 2022 年 1 月 16 日）、並びに 233HV101 試験（最終データ）から収集したものである。本項では、これらの試験のデザイン及び関連する統計解析手法について要約する。トフェルセンのより長期的な生物学的作用に関する情報を提示するため、薬力学（PD）及びバイオマーカー評価項目の解析用に 101 試験及び 102 試験のデータを統合した。

加えて、欧州医薬品庁での初回申請の審査中、Committee for Medicinal Products for Human Use（CHMP）は、脳脊髄液（CSF）中総 SOD1 タンパク質、並びに血漿中及び CSF 中 NfL に関して、

102 試験の追加のデータカットを要請した。

そのため、102 試験の 2023 年 2 月 28 日のデータカットに基づいてこれらの評価に関する 101 試験パート C 及び 102 試験の最新の統合解析を実施し、その結果を本概要に示す。

また、母集団薬物動態（PK）解析のために 101 試験及び 102 試験のデータもプールした。さらに、101 試験のパート A、B、及び C から得た CSF 中のトフェルセン曝露量及び PD／バイオマーカー（SOD1 タンパク質、NfL）のデータを用いて曝露－反応解析を実施した。

233AS303 試験の PK データは、本承認申請のデータカット時点では利用可能ではなかった。

1.1.1 完了した試験

1.1.1.1 233AS101 試験

101 試験は、SOD1 変異を有する ALS 患者にトフェルセンを投与して有効性、安全性、忍容性、PK、PD、及び免疫原性を検討する無作為化二重盲検プラセボ対照試験であった。当初は第 I 相単回投与用量漸増（SAD）（パート A）及び反復投与用量漸増（MAD）（パート B）試験としてデザインされたが、試験パート B のデータを検討した後に治験実施計画書が改訂され、第 III 相臨床試験（パート C）が追加された。第 III 相臨床試験は、SOD1 変異が確認された ALS 患者にトフェルセン 100 mg を投与し、ベネフィット・リスクプロファイルを明らかにするためにデザインされた。

パート A は、ALS 患者 20 例（16 例は SOD1 変異を有する ALS 患者）を対象にトフェルセンの 4 段階の用量（10、20、40、及び 60 mg）を検討する無作為化二重盲検プラセボ対照 SAD 試験であり、被験者はトフェルセン又はプラセボに 3：1 の比率で無作為化された。PK、PD、及び免疫原性評価用の CSF 及び血漿試料は、Table 1 に示すように採取した。

パート B は、SOD1 変異を有する ALS 患者を対象にトフェルセンの 4 段階の用量（20、40、60、及び 100 mg）を検討する無作為化二重盲検プラセボ対照 MAD 試験であった。計 50 例がトフェルセン又はプラセボに 3：1 の比率で無作為化された。PK、PD、及び免疫原性評価用の CSF 及び血漿試料は、Table 1 に示すように採取した。

パート C は、SOD1 変異を有する ALS 患者を対象にトフェルセン 100 mg の有効性及び安全性を検討するためにデザインされた無作為化二重盲検プラセボ対照第 III 相臨床試験であった。計 108 例（60 例は急速な疾患進行に関する予後エンリッチメント基準を満たした）がトフェルセン 100 mg 又はプラセボに 2：1 の比率で無作為化された。無作為化時には、エンリッチメントの基準、エダラボンの使用、リルゾールの使用という 3 つの因子で被験者を層別した。PK、PD、及び免疫原性評価用の CSF 及び血漿試料は、Table 1 に示すように採取した。

1.1.1.2 233HV101 試験

233HV101 試験は、健康成人被験者を対象に微量の ^{99m}Tc-MAG3-BIIB067（放射性標識トフェルセン）を非標識トフェルセンと同時に投与し、安全性、忍容性、及び分布を明らかにするためにデザインされた非盲検単回投与試験であった。ALS ではない被験者 8 例にトフェルセンを単回投

与した。そのうち 5 例は、医薬品の臨床試験の実施に関する基準（GCP）不遵守により最終的に試験を中止した実施医療機関 1 施設でトフェルセン 40 mg が投与されていた。これらの被験者から得たデータは報告されたが、解析は行われなかった。試験終了時点で、残る 3 例は他の実施医療機関で試験を完了していた。2 例は非標識トフェルセンと微量の ^{99m}Tc-MAG3-BIIB067 が投与されたが、1 例は調製ミスにより非標識トフェルセン 66.7 mg のみが投与された。詳細は 233HV101 試験の治験総括報告書（CSR）、Section 10.5（及び Section 10.5 は誤記のため、Erratum）を参照。

PK 及び免疫原性評価用の CSF 及び血清試料は、Table 1 に示すように採取した。本試験から得た PK 及び分布の結果に関する詳細は 233HV101 試験の CSR に示す。

1.1.2 実施中の試験

1.1.2.1 233AS102 試験

102 試験は、101 試験を完了した SOD1 変異を有する ALS 患者を対象に、非盲検下で IT 投与したトフェルセン 100 mg の長期の安全性、忍容性、免疫原性、PK、PD、及び有効性を評価する実施中の長期継続試験である。101 試験から計 139 例（パート A 及び B から 44 例、パート C から 95 例）が本試験に登録された。101 試験のパート A 及び B からの被験者では、101 試験での最終投与から 102 試験での初回投与までに 16 週間以上のウォッシュアウト期間を設けた。101 試験の安全性調査チームによって次の用量が承認された場合、102 試験に登録された被験者は、101 試験で承認された最高用量まで増量した。101 試験パート C の開始と並行して 102 試験を変更し、101 試験パート C を完了した被験者を受け入れることにした。これらの被験者では、102 試験での投与開始前にウォッシュアウト期間を設けなかった。その代わりに、101 試験の盲検性を維持するため、102 試験に盲検下での負荷投与期間を設け、負荷投与期間後はトフェルセンを非盲検下で投与した。102 試験で収集するデータの完全性を保つために（2.7.3 臨床的有効性、1.6.3.2 項）、101 試験の個々の被験者の盲検性は 102 試験が完了するまで維持される。さらに、101 試験パート C からの個々の被験者の割付け内容に対してアクセスが制限されたチームが、102 試験の実施を管理した。

上述のとおり、本モジュールでは、以下に示す 2 回の中間解析結果について記述する。

- 2021 年 7 月 16 日のデータカット時点のデータ。この日は 101 試験の完了日と同じであり、この時点で、101 試験パート C に登録されたすべての被験者が 6 ヵ月以上の追跡期間を有していた。
- 2022 年 1 月 16 日のデータカット時点のデータ。この時点で、101 試験パート C に登録されたすべての被験者が 12 ヵ月以上の追跡期間を有していた。

1.2 治験薬投与

臨床試験では、トフェルセンは IT 投与用の 20 mg/mL 注射液及び 6.7 mg/mL 注射液（それぞれ 100 mg/バイアル）として供給されている。臨床試験で使用したトフェルセン製剤の詳細は、「2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法」の 1.2.1 項に示す。

1.3 解析方法及び解析

個々の臨床薬理試験の PK 解析は、ノンコンパートメントモデルを用いて実施された。また、トフェルセンの臨床薬理学的なプロファイルをさらに特徴づけるために母集団 PK 解析を行った。母集団 PK 解析には完了した試験と実施中の試験を統合したデータセットを使用し、トフェルセンの母集団 PK パラメータを評価すること、PK 変動の有意な共変量を特定すること、及び特殊な集団での用法・用量を提供することを目的とした。

血漿、血清、及び CSF 中のトフェルセン濃度を測定するため、また、免疫原性を評価するための特異的な分析法が開発され、開発プログラム全体を通して使用された。これらの分析法はバリデートされ、頑健な一連の試料分析において適切な性能を示した。さらに、中枢神経系（CNS）組織試料中のトフェルセン濃度の測定には fit-for-purpose アッセイが使用された（2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法、1.3.1 項及び 1.3.3 項）。

SOD1-ALS の基礎病態生理及びトフェルセンの作用機序を考慮し、標的特異作用（Target Engagement）の間接的な指標として CSF 中総 SOD1 タンパク質を、市販のバリデートされた「fit-for-purpose」アッセイを用いて評価した（2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法、1.3.2 項）。このアッセイでは CSF 中総 SOD1 タンパク質を測定し、未変性の SOD1 タンパク質と並びに変異 SOD1 タンパク質やミスフォールドを起こした SOD1 タンパク質を区別しない。現時点では、ヒト体液（CSF 又は血液）試料中の変異 SOD1 タンパク質やミスフォールドを起こした SOD1 タンパク質を特異的に測定できる、バリデートされたアッセイ法は存在しない。SOD1 タンパク質濃度のアッセイ間での変動は最大で 15.6%である（SOD1 アッセイで報告された定量下限（LLOQ）でのアッセイの変動係数［CV］の最大値）［バリデーション報告書 TS067-008VR］。さらに、標的特異作用（Target Engagement）の患者特有の間接的マーカーとして SOD1 変異キャリアのみに存在する脱アミド化（例：修飾）SOD1 ペプチド［Gertsman 2019］を測定するため、新しい質量分析法が開発された。本概要作成の時点では、本アッセイのバリデーションに関する報告は得られていない。

疾患活性のバイオマーカーに対するトフェルセンの影響は、バリデート又は適格性を確認した「fit-for-purpose」免疫測定法を用いて CSF 及び血漿中ニューロフィラメント（リン酸化ニューロフィラメント重鎖［pNfH］及び NfL）の測定により評価された（2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法、1.3.4 項）。

当初は 101 試験パート A 及び B で採取した試料の評価には [redacted] プラットフォームが用いられていたが、その後、101 試験パート C 及び 102 試験用として [redacted] [redacted]（[redacted]）の NfL アッセイが用いられた。これは、[redacted] の NfL アッセイが CSF 及び血漿において良好な分析性能を有していたためである。[redacted] は、分析性能に加え、試料間の変動を抑制し、プレートバイアスを最小限にする完全自動化ランダムアクセス装置を使用しているため選択された（2.5 臨床に関する概括評価、2 項）。

1.4 薬物動態

トフェルセンは、CSF への IT 投与によって CNS 内の作用部位の近傍への投与が可能である。概して、CSF、血漿、及び血清中のトフェルセンの PK 特性は全試験を通して同様であり、ALS

被験者と健康被験者でも同様であった。

CSF

- トフェルセンの曝露量（トラフ値）は用量に伴い増加したが、その増加は 20～100 mg で用量比例性を下回った。
- 4 週間の負荷投与期間（2 週間間隔での 3 回の投与）の直後に CSF 中濃度は定常状態に達した。
- 負荷投与期間後のトフェルセンの CSF 中への蓄積はわずかであった。
- CSF 中トフェルセンの有効半減期は約 1 ヵ月であった。
- CSF 中のトフェルセンの濃度プロファイルにおける被験者間及び被験者内の変動は中程度～高度であり、大部分の CV が 50%を超えていた。

血漿

- IT ボーラス投与後、トフェルセンは CSF から CNS 組織及び全身循環に速やかに移行し、最高濃度到達時間（T_{max}）の中央値は 2～6 時間であった。
- トフェルセンの血漿中濃度は、最高濃度に達すると急激に減少した。この減少は全身組織に広範に分布したためと考えられた。
- 非ヒト霊長類（カニクイザルを含む）を用いたトフェルセンの非臨床 PK 試験と同様に、反復投与後にトフェルセンの血漿中への蓄積はわずか又はないことが確認された。
- Day 8 以降の血漿中濃度の多くは定量下限未満（BLQ）であったため、血漿中終末相 $t_{1/2}$ について意味のある推定はできなかった。
- トフェルセンの血漿中 PK は大きな変動が認められたが、最高血漿中濃度（C_{max}）及び濃度－時間曲線下面積（AUC）は、評価した用量範囲を通して、おおむね用量に比例して増加した。

組織分布

- トフェルセンを投与した患者から採取した剖検組織の分析で確認されたように、トフェルセンは CNS 組織中に広範に分布し、投与部位の近く（脊髄組織）が最も濃度が高かった。

薬物動態に影響を及ぼす内因性要因

トフェルセンの体内動態に影響を及ぼす可能性がある共変量は、101 試験及び 102 試験から得たデータを用いて、母集団 PK 解析によって評価された。結果は以下のとおり。

- 血漿中 PK に関して、以下に示す 3 つの有意な共変量が特定された：クリアランス（CL）に対する抗薬物抗体（ADA）の有無、CL に対するベースライン時の体表面積（BSA）、中心コンパートメントの分布容積（V2）に対する性別。
- 人種は、BSA の共変量効果に吸収された可能性が高く、曝露量の有意な共変量ではなかった。日本人被験者（101 試験パート C の被験者全体の 6.5%）にトフェルセン 100 mg を反復投与したときの PK パラメータは、外国人被験者と同様であった。

特殊な集団

肝機能及び腎機能障害を有する被験者を対象とした臨床試験は実施しなかった。2′-MOE は、エキソヌクレアーゼによる加水分解によって代謝されることが知られている［Yu 2007］（肝機能には依存しない）。これに加えてトフェルセンの PK とこれまでの臨床試験及び非臨床試験の結果を考慮すると、肝臓及び腎臓の影響はないと考えられる。

臨床試験でトフェルセンを投与した ALS 患者 166 例のうち、75 歳以上の 2 例を含め、22 例が 65 歳以上であった。これらの被験者間で臨床的 PK は、限られたデータであるが、全般的に差異は認められなかった。

SOD1 変異キャリアにおける若年発症型の筋力低下及び／又は筋萎縮の症例が報告されているが［De La Torre 2019; Hayward 1998; Ikeda 1995; Rezania 2003］、18 歳未満では SOD1-ALS は極めてまれである。平均発症年齢は 49.7 ± 12.3 歳である［Bali 2017］。そのため、小児患者を対象とした PK 試験は実施していない。

1.5 薬力学

1.5.1 CSF 中総 SOD1

トフェルセンは、SOD1 mRNA に結合して分解することにより SOD1 タンパク質の合成及び蓄積を抑制するよう設計されている。このことから、標的特異作用（Target Engagement）の間接的マーカーとして CSF 中総 SOD1 タンパク質を評価した。CSF 中総 SOD1 減少の治療目標閾値は確立されていないが、20%以上の減少（アッセイにおける変動及び生物学的変動を超えた閾値）を標的特異作用（Target Engagement）の確認の目標とした。CSF 中 SOD1 の結果から、トフェルセンがその標的に特異的に作用し、抑制することが示されている。

- トフェルセン投与により CSF 中総 SOD1 は速やかに、かつ持続的に減少した。
  - パート C の被験者では、Week 28 の intention-to-treat（ITT）集団において、CSF 中総 SOD1 タンパク質減少（ベースラインに対する幾何平均比［GMR］）はトフェルセン群が 35%、プラセボ群が 2%であった（プラセボに対するトフェルセンの GMR の差：34%、形式上 $p < 0.0001$）。疾患進行の部分集団（modified intent-to-treat［mITT］及び non-mITT 集団）でも同程度の減少が認められた（Table 8）。
    - CSF 中総 SOD1 タンパク質の減少は、101 試験パート B におけるトフェルセン 100 mg の 12 週間投与（2.1.2.3 項）及び 102 試験におけるトフェルセン後期開始群（プラセボ／投与開始遅延群）（2.1.4.3 項）でも認められた。
  - CSF 中総 SOD1 の減少は Week 8 頃までに明確となり、早期開始群では 52 週間の追跡期間中（3.4.1 項）、パート A 及び B の被験者では 104 週間の追跡期間中（3.4.1 項）を通して持続した。
- 非ヒト霊長類での非臨床試験データに基づく生理学的薬物速度論（PBPK）モデリング［Monine 2021］では、トフェルセン 100 mg 投与により、脊髄で 90%超及び皮質で約 30%の SOD1 が減少する可能性のある CNS 中曝露量に到達することが示唆されている。
- 母集団 PK/PD モデルにより、CSF 中の曝露量と CSF 中総 SOD1 タンパク質の反応との関係

が示され、定量化された（3.5.3 項）。

1.5.2 脱アミド化 SOD1

CSF 中総 SOD1 のデータを補足するため、標的特異作用（Target Engagement）の患者特有の間接的なマーカーとして SOD1 変異キャリアのみに存在する脱アミド化（例：修飾）SOD1 ペプチド［Gertsman 2019］を測定する新しい質量分析法を開発した。

- トフェルセン投与により、CSF 中の脱アミド化 SOD1 ペプチドが減少した。
  - 101 試験パート C の ITT 集団では、Week 16（解析を実施するための適切な検査試料が得られた最も遅い時点）で、トフェルセン群で 37%の減少（ベースラインに対する GMR）、プラセボ群で 2%の増加が認められた（2.1.3.4 項）。

1.5.3 ニューロフィラメント

ニューロフィラメントは、ニューロンのみに発現する中間径フィラメントであり、CNS 及び末梢神経系ニューロンの細胞骨格の足場の主要構成成分の 1 つである。ニューロフィラメントは、軽鎖（NfL）、中鎖（NfM）、及び重鎖（NfH）に加え、CNS では α-インターネキシン、末梢神経系ではペリフェリンから成るヘテロ重合体である［Yuan 2017］。軸索の損傷又は変性が生じると、ニューロフィラメントは間質液中に漏出する。そこから CSF 及び血液中に移行し、濃度測定が可能になる［Gaetani 2019; Khalil 2018］。

ニューロフィラメント濃度の増加は、神経変性疾患や他の病態生理学的プロセスを伴う疾患を含め、神経軸索損傷を特徴とする様々な神経疾患において報告されている［Verde 2021］。そのため、ニューロフィラメントは病態特異的マーカーではなく、軸索損傷及び神経変性の非特異的マーカーと考えられている［Verde 2021］。このように非特異的であるにもかかわらず、ALS におけるニューロフィラメント濃度は神経変性疾患の中で特に高く、その濃度は神経学的に健康な対照群の 7～10 倍である（2.5 臨床に関する概括評価、Figure 1）［Bridel 2019; Delaby 2020; Falzone 2020; Skillbäck 2017］。このことは、ALS が運動ニューロンの比較的急速な変性を特徴としており、その運動ニューロンが体内で最も長い軸索を有し、比較的大量のニューロフィラメントを含んでいるためと考えられる［Olsson 2019］。

過去 20 年間に蓄積されてきた文献では、とりわけ高いニューロフィラメント濃度により、ALS 患者と健康対照群及び他の多くの神経変性疾患患者が区別されることが一貫して確認されている［Benatar 2018; Delaby 2020; Feneberg 2018; Gaiottino 2013; Gille 2019; Halbgebauer 2022; Olsson 2019; Poesen 2017; Thompson 2022］。例えば、ALS 患者、ALS と誤診されやすい病態患者、及び対照群を用いた研究では、ALS 患者は血漿中 NfL 濃度が他のすべての比較対照、すなわち、他の運動ニューロン疾患患者（$p < 0.05$）、神経障害及び脊髄症患者（$p < 0.01$）、ミオパチー患者（$p < 0.01$）、並びに神経疾患のない対照群（$p < 0.01$）に比べて有意に高かった［Behzadi 2021］。このような増加は幅広い ALS 患者集団だけでなく遺伝的部分集団でも認められており［Benatar 2018; Steinacker 2016; Verde 2019; Weydt 2016］、血中濃度と CSF 中濃度との間には高い相関が認められる［Benatar 2018; Gaiottino 2013; Lu 2015; Steinacker 2017］。

ニューロフィラメント濃度は臨床的な症状発現後約 6～20 ヵ月にわたって増加し続け、その後

安定化すると考えられる［Benatar 2018; Brodovitch 2021; De Schaepdryver 2019b; Feneberg 2018; Gaiottino 2013; Gille 2019; Poesen 2017; Thompson 2022］。介入が行われなければ、時間の経過と共にニューロフィラメント濃度が著しく減少することはないと予想される。健康な人では加齢（並びに脳容積低下の減少と体格指数の減少）と共にニューロフィラメント濃度が増加し、次第にばらつきが大きくなることが示されている［Khalil 2020; Manouchehrinia 2020; Vågberg 2015］が、ALS 患者に関するほとんどの研究では、これらの結果は再現されていない。これはおそらくALSにおける軸索変性による増加の程度が、通常の加齢に伴う軸索喪失及び不顕性の併存疾患による軽度の増加を上回っているためと考えられる［Feneberg 2018; Rossi 2018; Thompson 2022; Verde 2019］。

長期的なニューロフィラメント濃度の増加は、ALSが臨床的に明らかに発現する前にも認められている［Benatar 2019; De Schaepdryver 2019a］。症状発現前のリスクを有する患者の長期自然経過及びバイオマーカー研究では、急速な疾患進行を伴う SOD1 変異を有する部分集団及び症状が臨床的に明らかに発現した患者で、血清及び CSF 中のニューロフィラメント濃度の増加が認められた［Benatar 2018］。具体的には、SOD1 A5V 変異キャリアでは、ALS の徴候・症状が発現する 6～12 ヵ月前に血清中 NfL 濃度が上昇していた。重要な点は、より幅広い ALS 患者集団（遺伝子変異の確認の有無を問わない）でも同様の所見が認められていることであり、症状発現前の時期に血清中 pNfH 濃度の経時的な増加が観察された［De Schaepdryver 2019a］。

いずれの研究においても、ニューロフィラメント濃度と疾患進行速度（症状発現からニューロフィラメント測定時点までの筋萎縮性側索硬化症機能評価尺度改訂版［ALSFRS-R］における進行速度により測定）との間には相関が認められている［Brodovitch 2021; De Schaepdryver 2020; Gille 2019］。また、ニューロフィラメントは、ALS における疾患進行及び生存の予後マーカーとしても詳細な特性分析が行われている［Abu-Rumeileh 2020; De Schaepdryver 2020; Lu 2015; Rossi 2018; Thompson 2022; Thouvenot 2020］。具体的には、ニューロフィラメント濃度が高いほど、経時的な ALSFRS-R の低下が大きい予測が示されている（2.5 臨床に関する概括評価、Figure 2）。英国で実施された多施設共同のバイオマーカー試験では、血漿中 NfL が、生存期間短縮に独立して関連する唯一の変数であった［Thompson 2022］。

脊髄性筋萎縮症（SMA）及び再発性多発性硬化症（MS）を含む他の神経疾患では、疾患修飾作用を伴う治療によりニューロフィラメント濃度が減少している［Darras 2019; De Vivo 2019; Disanto 2017; Gunnarsson 2011; Kuhle 2019; Sejbaek 2019］。SMA では、無イベント期間延長などの識別可能な臨床的ベネフィットが認められる以前に、こうした減少が先行していた［Finke 2017］。

ニューロフィラメントタンパク質は最初に、主に MS や ALS などの疾患において CSF 中で発見され、その特性が明らかにされた。さらに最近では、著しい技術の進歩と超高感度技術の開発により、新たなアッセイで、血漿や血清などの血液マトリックス中のニューロフィラメントを検出することが可能になった。NfL は臨床試験でよく用いられるマーカーとなっており、これは主にNfLアッセイの進歩と、安定性及び分析前の検討事項が重鎖と軽鎖で大きく変わらないことを示したデータセットによるものである［Koel-Simmelink 2014; Kuhle 2013; Thebault 2020］。現時点では、マトリックス（血液又はCSF）とアイソフォーム（重鎖又は軽鎖）のいずれを臨床検査に（又は臨床検査の裏付けに）優先して用いればよいかを示す、説得力のあるデータセットや文献

は存在しない。治験依頼者は、CSF に比べて血液採取の方が容易であること、CSF 中 NfL アッセイよりも先に血漿中 NfL アッセイの分析バリデーションが行われたことなどの実施上の理由から、血漿中 NfL を優先した。

血漿中 NfL は、101 試験パート C 及び 102 試験では主要な副次バイオマーカー評価項目の 1 つとして、101 試験パート A 及び B では探索的評価項目の 1 つとして評価された。101 試験及び 102 試験を通して、血漿及び CSF 中の pNfH 濃度、並びに CSF 中 NfL 濃度を探索的バイオマーカーに含めた。101 試験、102 試験、及びそれらを統合したデータから、以下が示されている。

- 文献と同様に、ベースライン時のニューロフィラメントは長期的な疾患進行の予後因子であることから、疾患の不均質性をコントロールするうえで有用であることが裏付けられた（2.7.3 臨床的有効性、1.4.2 項）。
  - 101 試験パート C のプラセボ群では、ベースライン時の血漿中 NfL 濃度は無作為化前及び導入期の ALSFRS-R スコアの傾きよりも、ALSFRS-R スコアの長期的低下との相関が強かった（233AS101 試験パート C の CSR、Figure 4、Figure 5、及び Figure 6）。
- トフェルセン投与により、ニューロフィラメントが経時的に確実かつ持続的に減少した。
  - 101 試験パート C の ITT 集団では、ベースラインから Week 28 までの間に血漿中 NfL 濃度がトフェルセン群で 55%減少（ベースラインに対する GMR）したのに対し、プラセボ群では 12%増加した（プラセボに対するトフェルセンの GMR の差：60%、事後の形式上 $p < 0.0001$）（Table 9）。形式上統計的に有意な血漿中 NfL の減少は、疾患進行の部分集団（mITT 及び non-mITT 集団）でも認められた［233AS101 試験パート C の CSR、Section 3］。同様の減少は 102 試験におけるトフェルセン後期開始群（プラセボ／投与開始遅延群）でも認められた（3.4.2 項）。
  - ニューロフィラメント濃度は Week 16 頃まで減少し、トフェルセン早期開始群では 52 週間の追跡期間中（Table 20）、パート A 及び B の被験者では 104 週間の追跡期間中を通して（Table 21）維持された。
  - 同様の減少は、すべてのマトリックス（CSF 及び血漿）及びアイソフォーム（NfL 及び pNfH）で認められた（Figure 14 及び Figure 15）。
- ALSFRS-R、静的肺活量（SVC）、ハンドヘルドダイナモメーター測定（HHD）、筋萎縮性側索硬化症評価質問票（ALSAQ-5）、EuroQol 5 Dimension, 5 Level Questionnaire（EQ-5D-5L）、及び生存を含む臨床評価項目での転帰を予測する代替バイオマーカーとして血漿中 NfL を評価するために、101 試験パート C のデータに基づいて因果推論の構成要素を含む統計的モデルを構築した。本モデルでは、ベースライン時のニューロフィラメント値が高いほど疾患進行が速いという点が考慮されているため、101 試験パート C などの 6 ヵ月間の試験中に治療効果が示される機会がより大きくなる。モデルでは、Week 16 のトフェルセンによるニューロフィラメント減少と Week 28 の臨床機能低下の緩徐化並びに無イベント期間及び生存期間の延長との間に明確な関係が示されている（2.1.3.5.2 項）。
- 母集団 PK/PD モデルにより、CSF 中の曝露量と NfL タンパク質の反応との関係が示され、定量化された（3.5.4 項）。

1.6 免疫原性の結果の概要

ADA 評価用にベースライン後の血漿試料を採取した 101 試験及び 102 試験のトフェルセン投与 166 例を対象に、血漿中のトフェルセンに対する免疫原性の反応を評価した（Integrated Summary of Safety［ISS］3, Appendix 2.5 Other Safety and Immunogenicity、Output 15）。

トフェルセンの初回投与直前に ADA が陰性であった被験者が、ベースライン後に 1 回以上陽性を示した場合は、治験薬投与後に発現した ADA 陽性と判定した。トフェルセンの初回投与直前に ADA 陽性であった被験者で、ベースライン後に 2 倍以上の抗体価上昇が 1 回以上認められた場合は、治験薬投与後に発現した ADA 陽性と判定した。

持続性の ADA 反応は、初回の陽性判定時点後の評価可能なデータのうち、112 日以上経過してから 2 回以上又は 112 日未満のうちに 1 回以上、ベースライン後の陽性判定があることと定義した。一過性の ADA 反応は、陽性判定が 1 回以上あり、持続性の ADA 反応が確認されないこと（ベースライン後に陽性が 1 回あり、その後 112 日以上、すべての結果が陰性であること、又はベースライン後 112 日未満のうちに 2 回以上陽性があり、その後、初回の陽性判定から 112 日以上経過して得られた試料が陰性であること）と定義した。

102 試験でいずれかの用量のトフェルセンを投与した被験者の 2022 年 7 月 15 日の中間データカットを含め、全体で、5 例（3.0%）がトフェルセンの初回投与前に ADA 陽性であった。トフェルセンを投与した被験者のうち 97 例（58.4%）で治験薬投与後に ADA の発現が認められ、このうち 14 例は一過性、83 例は持続性であった（ISS3, Appendix 2.5, Other Safety and Immunogenicity、Output 15 及び Integrated Summary of Immunogenicity, Appendix B）。

一般的にみられる ADA の影響とは異なり、トフェルセンの場合は、抗体の存在によって血漿中クリアランスが 32%低下した。これに関して考えられる理由として、データセットが小規模であること、スパースサンプリング、データのノイズ/シグナル比が高いことが挙げられる。トフェルセンの CSF 中の母集団 PK モデルは、CSF 中 PK に対する共変量の検討を目的に構築したものではなく、以後の PK/PD モデルの構築に利用できるよう CSF 中 PK を比較的現実的に適合させることを目的としたものである。ADA などの大きな分子の場合、血液脳関門を介した CSF コンパートメントへの移行は限定的であるため、ADA の発現が CSF 中 PK に著明な影響を及ぼすことはないと予想される。SOD1 タンパク質及び NfL を対象とした PK/PD モデルで ADA の影響を評価したが、いずれのモデルでも ADA は有意な共変量として特定されなかった（Appendix 2、Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of BIIB067 [Study No: CPP-21-004_PKPD]_Report V2.1）。

SOD1 タンパク質及び NfL のいずれの PK/PD モデルでも ADA は有意な共変量ではないことから、臨床効果に対する ADA の真の影響はないと予想される。持続性の ADA 反応が認められる被験者と他の被験者を比較した解析では、持続性陽性反応の被験者は、ALSFRS-R の経時的な変化で進行が小さいことが示唆された。ただし、これには、各群の被験者数が比較的少なかったことと個々の疾患の不均質性が交絡している可能性が高く、結論を導き出すのは困難である。同様に試験全体で、トフェルセンを投与された ADA 陽性被験者及び ADA 陰性被験者との間で、CSF 中総 SOD1 タンパク質及び血漿中 NfL 濃度の低下に明らかな差は認められなかった（Appendix 3.3.1、Output 37 及び Appendix 3.3.2、Output 28）。

安全性（医薬品規制調和国際会議国際医薬用語集［MedDRA］標準検索式［SMQ］により選択した有害事象［過敏症、アナフィラキシー反応、及び血管浮腫］の発現率を含む）に対するADAの明らかな影響は認められていない。重篤な神経学的 Adverse Drug Reaction（ADR）（脊髄炎、神経根炎、視神経乳頭浮腫、無菌性髄膜炎）の発現率に対する ADA の影響は認められなかった（「2.7.4 臨床的安全性」4.6 項）。

1.7 トフェルセン／薬物相互作用の可能性

- トフェルセンとの薬物相互作用の可能性は低いと評価されている。
  - 動物における代謝試験及び *in vitro* ヒト肝細胞試験では、トフェルセンにより肝代謝が阻害及び／又は誘導される可能性はないことが示されている。*In vitro* でのトランスポーター試験では、トランスポーターとの競合又はトランスポーターの阻害による薬物相互作用の可能性は非常に低いことが示されている。
  - トフェルセンは、臨床的に意味のある濃度以上の血漿中濃度（0.1～30 µg/mL）で高いヒト血漿タンパク結合率を示す（95%以上）（666853-IS03 試験）。しかし、この種の親水性 ASO 薬の結合部位は、低分子量の疎水性薬剤の結合部位とは異なる［Watanabe 2006］。したがって、血漿タンパク結合との競合による薬物相互作用の可能性は非常に低い。

2　　個々の試験結果の要約

本概要に記載された ALS 患者及び健康被験者を対象とした臨床試験のうち 3 試験を Table 1 に示す。

Table 1 Summary of Clinical Pharmacology Studies

Study No. Module	Dev. Phase	Study Design	Population Number of participants enrolled	Tofersen Dose/Regimen	Samples Collected			Status/ Section
					CSF	Plasma/Serum	Other	
233AS101 (CSR 233AS101 Parts A and B; CSR 233AS101 Part C) Module 5.3.5.1	1/2	**Part A SAD:** safety, tolerability, PK, PD, and immunogenicity of tofersen after a single IT injection of tofersen or placebo in participants with ALS	Participants with ALS n = 20[a]	Tofersen IT • Cohort 1 (n = 3): 10 mg • Cohort 2 (n = 3): 20 mg • Cohort 3 (n = 3): 40 mg • Cohort 4 (n = 6): 60 mg • Combined placebo (n = 5) Single Dose Day 1	PK and PD Day 1 (Predose), Days 8, 29, and 57	**PK** Day 1 (Predose and at 1, 2, 4, 6, and 24 hours Postdose [Day 2]), Days 8, 29, and 57 **PD** Days 1 (predose), 29, and 57 **Immunogenicity** Days 1 (predose), 8, 29, and 57	NA	Completed Section 2.1.1

Study No. Module	Dev. Phase	Study Design	Population Number of participants enrolled	Tofersen Dose/Regimen	Samples Collected			Status/ Section
					CSF	Plasma/Serum	Other	
	1/2	**Part B MAD:** safety, tolerability, PK, PD, and immunogenicity of tofersen after multiple ascending IT injections of tofersen or placebo in participants with *SOD1*-ALS	Participants with *SOD1*-ALS n = 50	Tofersen IT • Cohort 5 20 mg (n = 10) • Cohort 6 40 mg (n = 9) • Cohort 7 60 mg (n = 9) • Cohort 8 100 mg (n = 10) • Combined placebo (n = 12) Loading dose on Days 1, 15, and 29 Maintenance dosing on Days 57 and 85	**PK and PD** Day 1 (Predose) Day 15, 29, 57, 85,106, and 169 (predose)	**PK** Day 1 (predose and at 1, 2, 4, 6, and 24 hours [Day 2], Postdose), Days 15, 29, and 57, (predose) Day 85 (Predose and at 1,2,4, and 6 hours Postdose) Days 8, 22, 36, 64, 92, 106, and 169 **PD** Day 1 (Predose), Days 15, 29,57, 85, 106 and 169 **Immunogenicity** Day 1 (predose), Day 8, 22, 36, 64, 92, 106, and 169	NA	Completed Section 2.1.2

Study No. Module	Dev. Phase	Study Design	Population Number of participants enrolled	Tofersen Dose/Regimen	Samples Collected			Status/ Section
					CSF	Plasma/Serum	Other	
	3	**Part C Pivotal:** Efficacy, safety, PK, PD, and immunogenicity of tofersen after multiple IT injections of tofersen or placebo in participants with *SOD1*-ALS	Participants with *SOD1*-ALS n = 60 (mITT) n = 48 (non-mITT)	Tofersen IT • 100 mg (n = 72) • Placebo (n = 36) Loading doses on Days 1, 15, and 29 Maintenance dosing on Days 57, 85, 113, 141, and 169	**PK and PD** Days 1, 15, 29, 57, 85, 113, 141, and 169 (predose) Day 197 (4 weeks after last dose)	**PK** Days 1 and 85 (predose and at 1, 2, 4, and 6 hours postdose) Days 15, 29, 57, 113, 141, and 169 (predose) Day 197 (4weeks after last dose) **PD** Days 1, 15, 29, 57, 85, 113, 141, and 169 (Predose) Day 197 (4weeks after last dose) **Immunogenicity** Days 1, 15, 29, 57, 85, 113, 141, and 169 (predose) Day 197 (4weeks after last dose)	NA	Completed Section 2.1.3

Study No. Module	Dev. Phase	Study Design	Population Number of participants enrolled	Tofersen Dose/Regimen	Samples Collected			Status/ Section
					CSF	Plasma/Serum	Other	
233AS102 (CSR 233AS102 Interim 1, 16 July 2021 data cut and CSR 233AS102 Interim 2, 16 January 2022 data cut) Module 5.3.5.2	3	Long-term safety, tolerability, PK, PD, immunogenicity and efficacy of open-label tofersen after multiple IT injections of tofersen in participants with *SOD1*-ALS who previously completed Study 101[b]	Participants with *SOD1*-ALS n = 95 [Part C] n = 44 [Parts A and B]	Tofersen IT 100 mg (n = 139) Loading doses on Days 1, 15, and 29 Maintenance dosing on Weeks 8, 12, and 16 and every 4 weeks thereafter, up to Week 360	**PK and PD** Days 1, 15, and 29 (predose) Weeks 8, 12, and 16 and every 4 weeks thereafter, up to Week 360 (predose) 4 Weeks after the last dose	**PK and Immunogenicity** Days 1, 15, and 29 (predose) Weeks 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 92, 100, 108, 116, 124, 132, 140, 148, 156, 164, 172, 180, 188, 196, 204, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332, 340, 348, and 356 (predose) 4 Weeks after the last dose **PD** Days 1, 15, 29 (predose) Weeks 8, 12, and 16 and every 4 weeks thereafter, up to Week 360 (predose) 4 Weeks after the last dose	CNS tissues (for 3 participants who died and had autopsy samples) for PK	Ongoing 2 interim data cutoff[c] Section 2.1.4

Study No. Module	Dev. Phase	Study Design	Population Number of participants enrolled	Tofersen Dose/Regimen	Samples Collected			Status/ Section
					CSF	Plasma/Serum	Other	
233HV101 CSR 233HV101 Module 5.3.5.3	1	Open-label, 4-cohort, single-dose study to determine the safety, tolerability, and distribution of a microdose of radiolabeled tofersen co-administered with unlabeled tofersen in healthy adult participants	Healthy Volunteers n = 3[c]	Tofersen IT (containing up to 100 µg radiolabeled tofersen) 100 mg (n = 3[d]) Single dose Day 1	**PK and PD** Day 1 (predose) and 15 (postdose)	**PK** Day -1 or Day 1 (predose) (Day 1 (1, 2, 4, and 24 hours [Day 2] postdose) Days 15 and 29 **Immunogenicity**[e] Day -1 or Day 1 (predose) Day 29	NA	Completed/Terminated Section 2.1.5

a A total of 6 participants in Study 101 Part A did not have a SOD1 mutation, since this was not required prior to Protocol Version 2.0. None of these 6 participants enrolled in Study 102; 2 only received placebo while 4 received a single dose of tofersen.

b Participants entered the 233AS102 extension receiving tofersen doses corresponding to their cohort assignment from Study 101 Part B MAD (ranging from 20 to 60 mg). All participants were eventually escalated to the tofersen 100 mg dose.

c Data are included up to 16 July 2021 and 16 January 2022 interim data cut off, with full cleaning and interim lock of the data.

d In total, 8 participants without ALS were exposed to a single dose of tofersen. Of these, tofersen 40 mg was administered to 5 participants at a site that was ultimately discontinued due to GCP noncompliance; data from these participants were reported but not analyzed. At the time of termination, remaining 3 participants completed the study at another site, 2 received unlabeled tofersen 100 mg and 1 participant received only 66.7 mg of unlabeled tofersen due top preparation error. For further details refer to CSR 233HV101.

e Immunogenicity samples were collected but not analyzed.

2.1 SOD1 変異を有する ALS 患者における薬物動態及び薬力学

2.1.1 233AS101 試験 － パート A

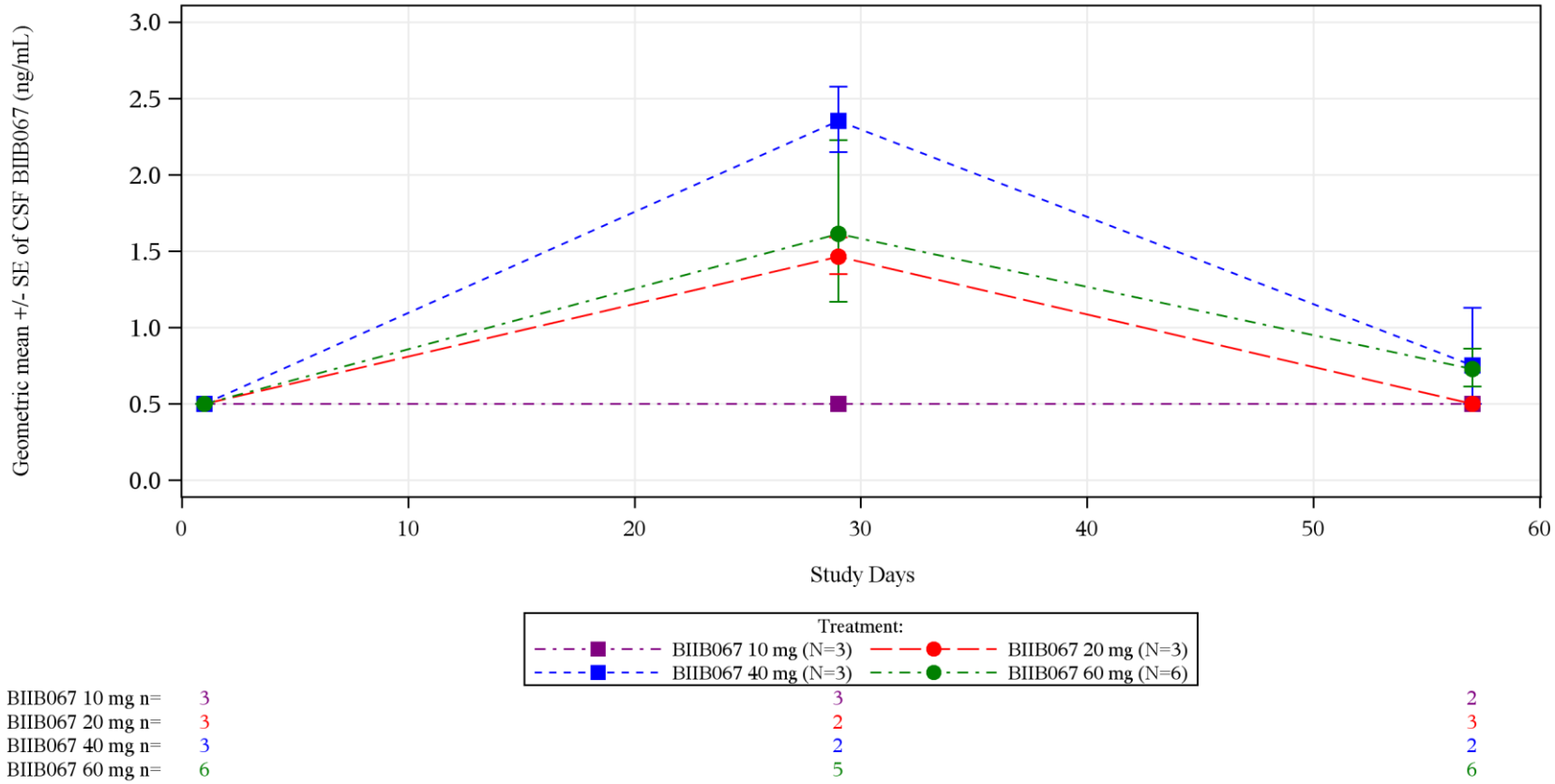
101 試験の目標被験者数の検討及びデータの完全性を確保するために実施した方法を「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.1 項及び 1.6.3.2 項に要約した。パート A 及び B の統計解析手法の詳細は、「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.4.1 項及び 233AS101 試験パート A 及び B の CSR の Appendix 16.1.9、233AS101 試験パート A 及び B の統計解析計画書（SAP）第 [redacted] 版に記載されている。事後に加えた解析の変更は、233AS101 試験パート A 及び B の CSR に記載されている。

2.1.1.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果

トフェルセン 10 mg を投与したすべての被験者での CSF 中トフェルセン濃度は、すべての試料採取時点で BLQ であった。20 mg 以上では、トフェルセン濃度は用量に伴って増加し、その増加は用量比例性を下回った（Figure 1）。

Figure 1 Study 233AS101 Part A: CSF Tofersen Concentration (ng/mL) Geometric Mean Values ± SE by Visit - PK Population

CSF BIIB067 concentration (ng/mL) geometric mean values +/- SE by visit - Part A (SAD) PK population
Page: 1 of 1



NOTE 1: Data points where n = 1 have not been presented.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
Source:biib067/233as101-parta/csr/f-pkpd-csf-gmean-byvis-pk.sas Run Date:04OCT2019

2.1.1.2 血漿中トフェルセンの薬物動態の結果

トフェルセンは、IT 投与後最初に CNS 組織に分布するが、本剤は投与部位（CSF）から全身循環に速やかに移行し、投与後数時間以内に用量依存的な平均血漿中 C_{max} が認められた（Figure 2）。本剤の平均血漿中濃度は通常、C_{max} に達すると急激に減少し、これは主に血漿から全身組織に広範に分布したためであった。101 試験パート A（SAD）でトフェルセンを単回投与した被験者の血漿中濃度は、Day 8（投与 168 時間後）及びそれ以降の時点で BLQ となり、血漿中終末相 $t_{1/2}$ を推定することはできなかった。AUC の時間を無限大まで外挿するにはデータが不十分であったため、血漿中クリアランスの推定値は算出しなかった。

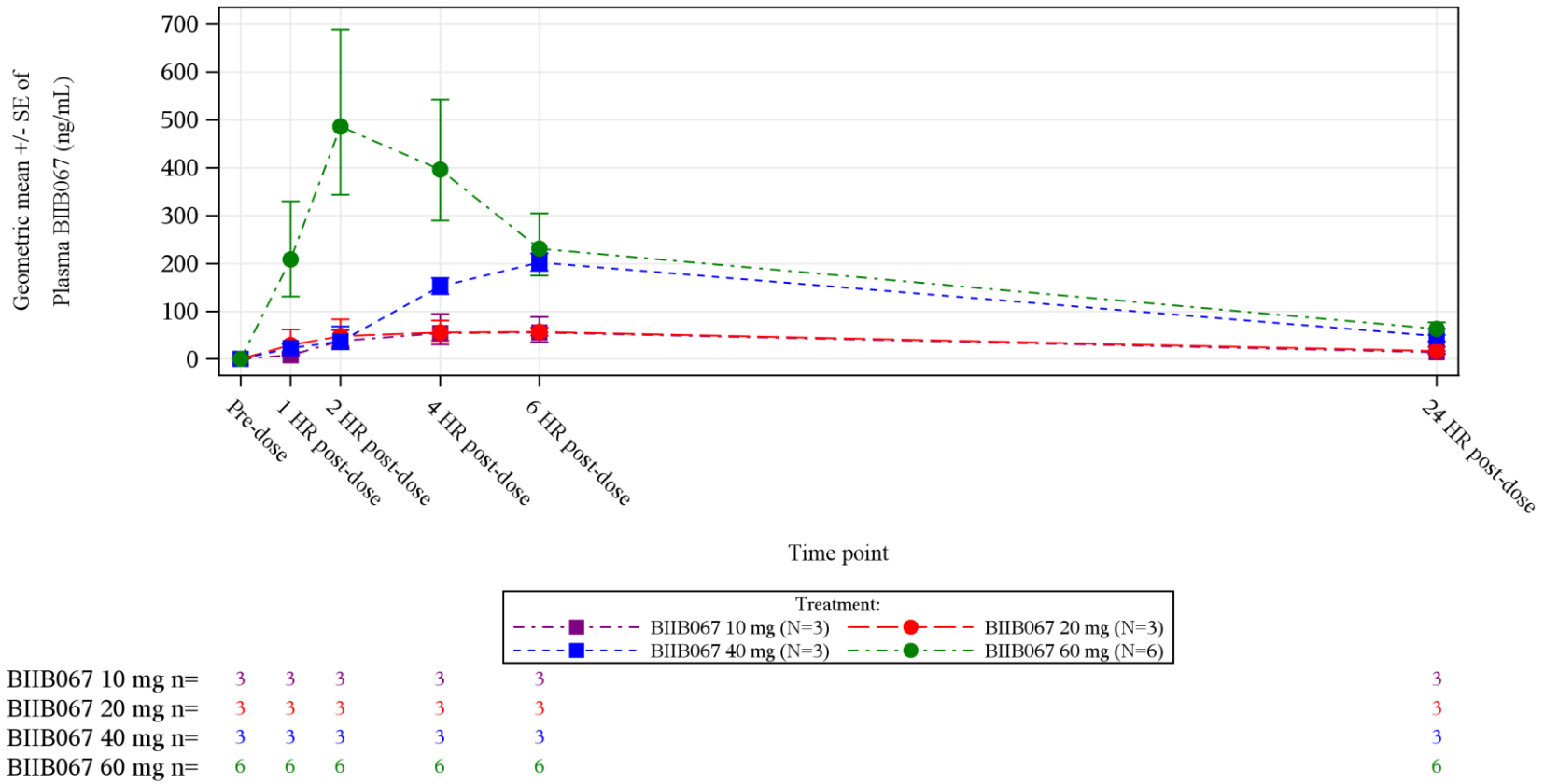
パート A の被験者での Day 1 のトフェルセン単回投与後の血漿中 PK パラメータの要約を Table 2 に示す。

トフェルセンの血漿中曝露量は用量に伴い増加したが、変動が大きく、被験者数が少なかったため、正式な PK 線形解析は実施しなかった。C_{max} と投与後 0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24h}$）の中央値はいずれも、6 倍の用量範囲まではおおむね用量に比例すると考えられた。最高用量群の T_{max} の中央値は投与開始から 2 時間であり、10、20、40 mg 群（それぞれ 4、6、6 時間）よりも早い到達であった。ただし、すべての投与群の実測値の範囲は同程度（2～6 時間）であった。

C_{max} の実測値の範囲から、PK に大きな変動（最高値と最低値との間がおおむね 2～4 倍、時に最大 9 倍）があることが示された［233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 11.1.2.1.1］。

Figure 2 Study 233AS101 Part A (SAD): Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) Geometric Mean Values ± SE at Day 1 - PK Population

Plasma BIIB067 concentration (ng/mL) geometric mean values +/- SE at day 1 - Part A (SAD) PK population
Page: 1 of 1



NOTE 1: Data points where n = 1 have not been presented.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
Source:biib067/233as101-parta/csr/f-pkpd-con-gmean-d1-pk.sas Run Date:07OCT2019

Table 2 Study 233AS101 Part A (SAD): Pharmacokinetic Parameters of Tofersen on Day 1 - PK Population

Pharmacokinetic parameters of BIIB067 on Day 1 - Part A (SAD) PK population

Page: 1 of 2

	BIIB067 10 mg (N=3)	BIIB067 20 mg (N=3)	BIIB067 40 mg (N=3)	BIIB067 60 mg (N=6)
AUC[0-24h] (hour*ng/mL)				
n	3	3	3	6
Mean (SD)	1053.97 (810.991)	1039.41 (199.714)	2914.72 (600.441)	5728.85 (2846.896)
Geometric mean	879.86	1027.18	2873.77	5196.11
Geometric mean -/+ SE	584.2, 1325.0	922.3, 1144.0	2551.5, 3236.8	4259.3, 6338.9
Median	621.58	975.90	2853.55	5088.10
Q1, Q3	550.80, 1989.53	879.18, 1263.16	2347.20, 3543.40	4784.30, 6025.10
Min, Max	550.8, 1989.5	879.2, 1263.2	2347.2, 3543.4	2410.2, 10977.3
Max Conc (ng/mL)				
n	3	3	3	6
Mean (SD)	80.73 (67.839)	85.10 (52.554)	203.67 (31.086)	686.83 (487.595)
Geometric mean	64.94	75.06	202.09	529.63
Geometric mean -/+ SE	41.4, 101.8	52.8, 106.7	185.1, 220.7	375.1, 747.8
Median	44.40	68.30	201.00	623.50
Q1, Q3	38.80, 159.00	43.00, 144.00	174.00, 236.00	299.00, 977.00
Min, Max	38.8, 159.0	43.0, 144.0	174.0, 236.0	148.0, 1450.0

Source:biib067/233as101-parta/csr/t-pkpd-pkparams-day1-pk.sas Run Date:04NOV2019

Pharmacokinetic parameters of Tofersen on Day 1 - Part A (SAD) PK population
Page: 2 of 2

	BIIB067 10 mg (N=3)	BIIB067 20 mg (N=3)	BIIB067 40 mg (N=3)	BIIB067 60 mg (N=6)
Time of CMAX (HOURS)				
n	3	3	3	6
Mean (SD)	4.67 (1.155)	4.67 (2.309)	6.00 (0.000)	3.00 (1.673)
Geometric mean	4.58	4.16	6.00	2.70
Geometric mean -/+ SE	4.0, 5.2	2.9, 6.0	6.0, 6.0	2.2, 3.3
Median	4.00	6.00	6.00	2.00
Q1, Q3	4.00, 6.00	2.00, 6.00	6.00, 6.00	2.00, 4.00
Min, Max	4.0, 6.0	2.0, 6.0	6.0, 6.0	2.0, 6.0

Source:biib067/233as101-parta/csr/t-pkpd-pkparams-day1-pk.sas Run Date:04NOV2019

2.1.1.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質

10、20、40、及び 60 mg のトフェルセンを単回投与後、CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度に意味のある変化は認められなかった。被験者数が少なく、治験薬投与期間が短いため、データの解釈は限定的であった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 11.1.2.2.3.1）。

2.1.1.4 ニューロフィラメント

ベースラインから投与後 Day 57 までに、血漿及び CSF 中の pNfH 又は NfL 濃度に意味のある変化は認められなかった。被験者数が少なく、治験薬投与期間が短いため、データの解釈は限定的であった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 11.1.2.2.4.1）。

2.1.1.5 免疫原性の結果

すべての被験者（トフェルセン投与 15 例及びプラセボ投与 5 例）でベースライン時の抗体検査は陰性であった。トフェルセンを投与した 1 例（6.7%）で 101 試験パート A の期間中に、治験薬投与後に ADA の発現が認められた。この被験者はトフェルセン 60 mg を単回投与した後の Day 8 に陽性と判定されたが、Day 29 及び Day 57 ではいずれも ADA 陰性となった。さらに、プラセボ群の 1 例（20.0%）が Day 8 の時点で陽性と判定され、その後のすべての検査で陽性であった。この被験者はトフェルセンを投与されなかったため、治験薬投与後に抗体を発現したとはされなかった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 12.1.5）。

2.1.2 233AS101 試験 ― パート B

101 試験の目標被験者数の検討及びデータの完全性を確保するために実施した方法を「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.1 項及び 1.6.3.2 項に要約した。パート A 及び B の統計解析手法の詳細は、「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.4.1 項及び 233AS101 試験パート A 及び B の CSR の Appendix 16.1.9、233AS101 試験パート A 及び B の SAP 第 ■ 版に記載されている。事後に加えた解析の変更は、233AS101 試験パート A 及び B の CSR に記載されている。

2.1.2.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果

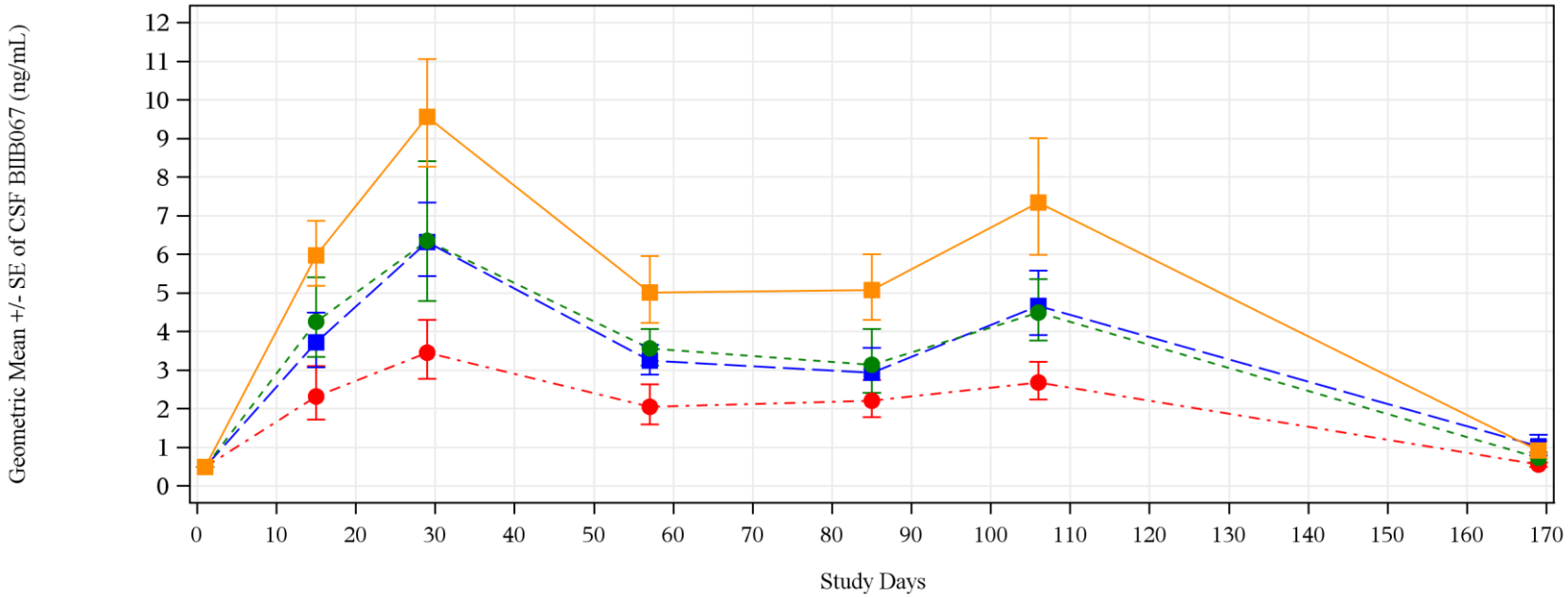
IT 投与後、CSF 中トフェルセンのトラフ濃度は用量に伴って増加したが、その増加は用量比例性を下回り、用量 100 mg の定常状態での CSF 中濃度は、用量 20 mg での濃度より約 2～3 倍高くなった。CSF 中濃度は 100 mg 群で最高、20 mg 群で最低となり、40 及び 60 mg 群では同程度であった。

来院時毎のトフェルセン CSF 中濃度（平均 ±標準誤差［SE］）推移を Figure 3 に示す。CSF 中濃度の推移から、負荷投与期間（2 週間間隔で 3 回の投与）の直後に、反復投与での定常状態に達することが示されている。CSF 中トラフ濃度の最高値は 3 回目投与（負荷投与期間の最終投与）後（Day 29）に認められた。負荷投与期間後に月 1 回投与したときの蓄積はわずか又はなく、蓄積比は 2 倍未満と考えられ、非ヒト霊長類を用いた SOD1 試験から得たデータと同様である。この CSF 中の蓄積は、CSF 中トフェルセンの半減期が約 1 ヵ月であることを示している。

CSF 中の濃度プロファイルの被験者間及び被験者内変動は中程度～高度（CV が 50%超）であった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 11.2.2.1.1）。

Figure 3 Study 233AS101 Part B (MAD): CSF Tofersen Concentration (ng/mL) Geometric Mean Values ± SE by Visit - PK Population

CSF BIIB067 concentration (ng/mL) geometric mean values +/- SE by visit - Part B (MAD) PK population
Page: 1 of 1



BIIB067 20 mg n=	10	10	9	9	9	9	8
BIIB067 40 mg n=	9	9	9	9	9	9	6
BIIB067 60 mg n=	8	8	9	9	9	8	7
BIIB067 100 mg n=	10	10	10	10	10	10	8

NOTE 1: Data points where n = 1 have not been presented.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid.
Source:biib067/233as101-partb/csr/f-pkpd-csf-gmean-byvis-pk.sas Run Date:04NOV2019

2.1.2.2 血漿中トフェルセンの薬物動態の結果

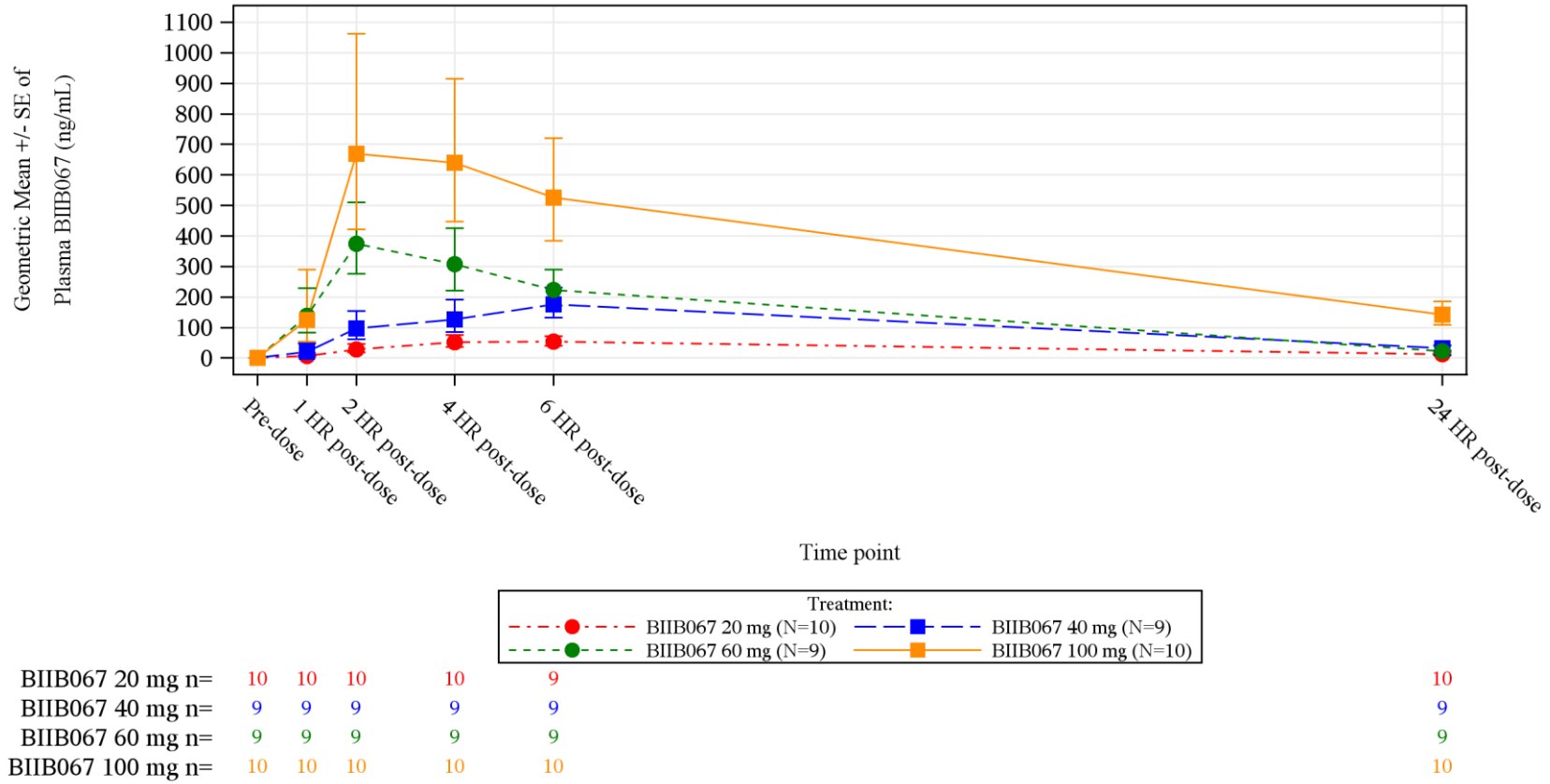
トフェルセンの実測血漿中濃度は投与から 2～6 時間後に最高となった（Figure 4）。AUC 及び C_{max} は用量依存的であったが、用量比例性は評価できなかった。曝露量は、20～60 mg の間でほぼ線形に増加したが、100 mg コホートでは用量に比例しているようであった。曝露量は、おおむね MAD 期の初回投与時と最終投与時で同程度であり、それぞれの SAD のパラメータとも同程度であった（Figure 5）。予想されたとおり、負荷投与期間後の血漿中の蓄積はわずか又はなかった。SOD1 変異を有する ALS 患者でのトフェルセン反復投与後の血漿中 PK パラメータの要約を Table 3 に示す。

MAD コホートで実薬を投与した被験者の多くで、Day 8（投与 168 時間後）以降の血漿中濃度は BLQ であった。Day 8 以降の測定値が BLQ であったことから、観察された血漿中濃度の減少は再分布相を示すと考えられ、血漿中終末相 $t_{1/2}$ を推定することはできなかった。

トフェルセンの C_{max} 及び投与後 0 時間から 6 時間までの濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}6hr}$）の被験者間変動は、おおむね中程度～高度であった（%CV が 50%超を示すことが多かった）［233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 11.2.2.1.1 項］。

Figure 4 Study 233AS101 Part B: Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) Geometric Mean Values ± SE at Day 1 - PK Population

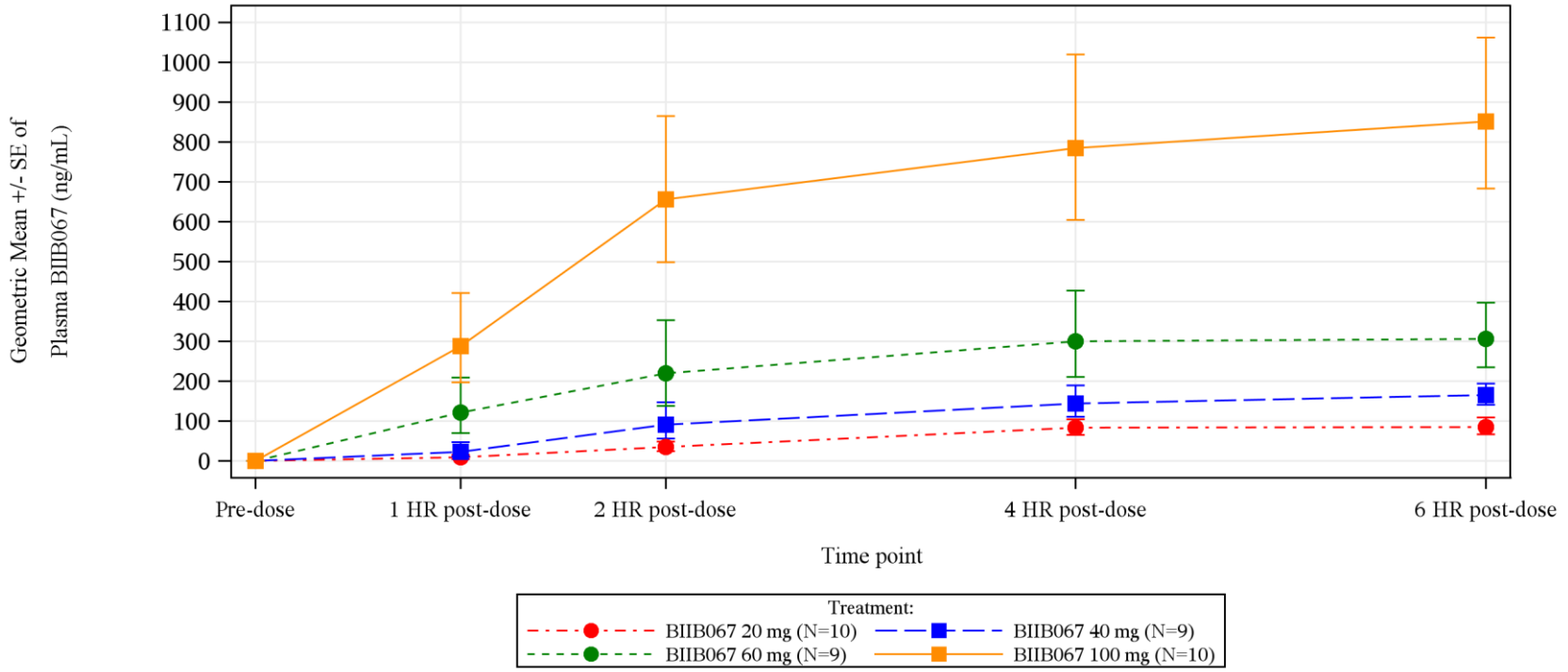
Plasma BIIB067 concentration (ng/mL) geometric mean values +/- SE at day 1 - Part B (MAD) PK population
Page: 1 of 1



NOTE 1: Data points where n = 1 have not been presented.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
Source:biib067/233as101-partb/csr/f-pkpd-con-gmean-d1-pk.sas Run Date:04NOV2019

Figure 5 Study 233AS101 Part B: Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) Geometric Mean Values ± SE at Day 85 - PK Population

Plasma BIIB067 concentration (ng/mL) geometric mean values +/- SE at day 85 - Part B (MAD) PK population
Page: 1 of 1



BIIB067 20 mg n=	9	9	9	9	9
BIIB067 40 mg n=	9	8	8	8	8
BIIB067 60 mg n=	9	9	9	9	9
BIIB067 100 mg n=	10	10	10	10	10

NOTE 1: Data points where n = 1 have not been presented.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
Source:biib067/233as101-partb/csr/f-pkpd-con-gmean-d85-pk.sas Run Date:04NOV2019

Table 3 Study 233AS101 Part B: Pharmacokinetic Parameters of Tofersen - PK Population

Pharmacokinetic parameters of BIIB067 - Part B (MAD) PK population

Page: 1 of 2

	BIIB067 20 mg (N=10)	BIIB067 40 mg (N=9)	BIIB067 60 mg (N=9)	BIIB067 100 mg (N=10)
Day 1				
AUC[0-24h] (hour*ng/mL)				
n	10	9	9	10
Mean (SD)	1192.82 (630.494)	3501.00 (2005.443)	4970.60 (2732.748)	13662.68 (7932.218)
Geometric mean	1009.85	2875.13	4289.16	11344.47
Geometric mean -/+ SE	820.5, 1242.9	2237.9, 3693.7	3503.5, 5250.9	9144.7,14073.3
Median	1241.17	2449.50	4614.60	12402.45
Q1, Q3	515.08, 1719.60	2409.90, 4472.22	3556.60, 6241.90	8380.90, 19738.80
Min, Max	372.8, 2192.3	541.1, 6984.8	1347.6, 10637.1	4025.5, 26143.0
Max Conc (ng/mL)				
n	10	9	9	10
Mean (SD)	121.85 (118.837)	350.92 (315.466)	603.56 (569.433)	1414.40 (1124.249)
Geometric mean	80.75	229.41	437.28	1031.74
Geometric mean -/+ SE	59.2, 110.1	160.0, 328.9	332.0, 576.0	782.7, 1360.0
Median	89.50	164.00	369.00	1065.50
Q1, Q3	30.80, 124.00	159.00, 481.00	263.00, 708.00	589.00, 2130.00
Min, Max	20.1, 393.0	26.3, 948.0	128.0, 1930.0	285.0, 3530.0
Time of CMAX (HOURS)				
n	10	9	9	10
Mean (SD)	10.40 (9.513)	4.44 (2.128)	2.89 (1.691)	7.00 (9.092)
Geometric mean	7.01	3.68	2.44	3.67
Geometric mean -/+ SE	5.2, 9.5	2.9, 4.7	2.0, 3.0	2.6, 5.3
Median	6.00	6.00	2.00	3.00
Q1, Q3	4.00, 24.00	4.00, 6.00	2.00, 4.00	2.00, 6.00
Min, Max	2.0, 24.0	1.0, 6.0	1.0, 6.0	1.0, 24.0

Source:biib067/233as101-partb/csr/t-pkpd-pkparams-day1-pk.sas Run Date:06NOV2019

Pharmacokinetic parameters of BIIB067 - Part B (MAD) PK population
Page: 2 of 2

	BIIB067 20 mg (N=10)	BIIB067 40 mg (N=9)	BIIB067 60 mg (N=9)	BIIB067 100 mg (N=10)
Day 85				
Max Conc (ng/mL)				
n	9	8	9	10
Mean (SD)	131.23 (64.623)	245.09 (170.572)	546.68 (395.630)	1490.80 (1009.051)
Geometric mean	112.74	199.69	411.00	1181.83
Geometric mean -/+ SE	90.9, 139.8	157.0, 254.0	304.5, 554.8	914.0, 1528.1
Median	140.00	203.50	530.00	1410.00
Q1, Q3	77.20, 190.00	102.05, 359.50	461.00, 606.00	910.00, 1650.00
Min, Max	29.7, 203.0	93.6, 537.0	74.1, 1450.0	170.0, 3990.0
Time of CMAX (HOURS)				
n	9	8	9	10
Mean (SD)	4.22 (1.563)	4.63 (2.066)	3.67 (2.000)	4.30 (1.767)
Geometric mean	3.93	3.97	3.12	3.82
Geometric mean -/+ SE	3.4, 4.5	3.1, 5.1	2.5, 3.9	3.2, 4.6
Median	4.00	6.00	4.00	4.00
Q1, Q3	4.00, 6.00	3.00, 6.00	2.00, 6.00	4.00, 6.00
Min, Max	2.0, 6.0	1.0, 6.0	1.0, 6.0	1.0, 6.0

Source:biib067/233as101-partb/csr/t-pkpd-pkparams-day1-pk.sas Run Date:06NOV2019

2.1.2.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質

101 試験パート B では、CSF 中総 SOD1 タンパク質のベースラインから Day 85 までの変化量が副次評価項目として評価された。

40、60、及び 100 mg MAD コホートでは、プラセボと比較して、ベースラインからの CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度の減少が認められた。反復測定値の混合効果モデル（MMRM）に基づき、投与期間（Day 1～85）中の総 SOD1 タンパク質濃度の GMR は、トフェルセン 20、40、60、及び 100 mg 群でそれぞれ 1%、27%、21%、及び 36%減少し、プラセボ群では 3%減少した（Table 4）。CSF 中総 SOD1 タンパク質の減少の程度は、用量に比例せず、これは、トフェルセン 40 mg 及び 60 mg の投与群間で PK が一貫して重なっているためと考えられた。

Day 85 で 100 mg 群とプラセボ群の間に形式上統計的に有意な差が認められた（$p < 0.0001$）［233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 11.2.2.2.3.1］。100 mg 群のすべての被験者は、CSF 中総 SOD1 タンパク質が 20%～50%の減少を示し、20%の減少から 60%の増加を示したプラセボ群のいずれの被験者よりも大きく減少していた（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Figure 9 及び Table 56）。

実薬投与中、CSF 中総 SOD1 タンパク質の減少は持続的かつ時間依存的で、プラトーは認められなかった。CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度の減少は 57 日後に最も顕著となり、定常状態までの期間（Day 29）及びヒトでの SOD1 タンパク質の推定半減期（約 30 日）と一貫している［Crisp 2015］。SOD1 タンパク質は最終投与（Day 85）の時点又はその直後に最大の減少を示した。

CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度は、ベースライン時の濃度と減少の程度がトフェルセン 100 mg の急速進行型の部分集団とその他の部分集団でおおむね類似していたため、疾患進行速度に依存していないと考えられた（Table 4）。

101 試験パート B は、12 週間の治験薬投与期間に続いて 12 週間の休薬期間（Week 24［Day 169］まで）を設けるデザインであった。トフェルセン 100 mg 群では、Week 24 の CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度が投与期間中（Day 85）に比べて増加していたが、ベースライン時に比べると低い値のままであった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Figure 10）。

詳細は 233AS101 試験パート A 及び B の CSR の Section 11.2.2.2.3.1 に示す。

Table 4 Study 233AS101 Part B: Summary of Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline in Total CSF SOD1 Protein on Day 85

			Tofersen			
Population	Parameter	Placebo	20 mg	40 mg	60 mg	100 mg
Overall	GMR to baseline (95% CI)	N=12 0.97 (0.83, 1.13)	N=10 0.99 (0.83, 1.18)	N=9 0.73 (0.61, 0.87)	N=8 0.79 (0.66, 0.94)	N=10 0.64 (0.55, 0.76)
	Tofersen: Placebo Differences in GMR (95% CI)		1.02 (0.82, 1.27)	0.75 (0.60, 0.95)	0.81 (0.65, 1.02)	0.67 (0.53, 0.84)
	p-value (Compared to Placebo)	N/A	0.3913	0.0002	0.0641	<0.0001
Fast-progressor	GMR to baseline (95% CI)	N=4 1.01 (0.74, 1.37)	N=1 0.87 (0.58, 1.32)	N=1 0.81 (0.53, 1.25)	N=1 0.78 (0.51, 1.20)	N=4 0.59 (0.45, 0.77)
	Tofersen: Placebo Differences in GMR (95% CI)		0.86 (0.52, 1.45)	0.81 (0.45, 1.43)	0.78 (0.48,1.25)	0.58 (0.36,0.95)
	p-value (Compared to Placebo)	N/A	0.1573	0.1573	0.1573	0.0209
Other	GMR (95% CI)	N=8 0.98 (0.81, 1.19)	N=9 1.03 (0.84, 1.26)	N=8 0.73 (0.60, 0.90)	N=7 0.81 (0.66, 1.00)	N=6 0.68 (0.54, 0.86)
	Tofersen: Placebo Differences in GMR (95% CI)		1.05 (0.80,1.38)	0.75 (0.56, 1.00)	0.83 (0.62, 1.10)	0.69 (0.51, 0.94)
	p-value (Compared to Placebo)	N/A	0.2110	0.0011	0.1649	0.0019

NOTE 1: Baseline was defined as Day 1 value prior to the study drug. If the Day 1 value was missing, the non-missing value (including the Screening Visit) closest to and prior to the first dose was used as the baseline value, if collected.
NOTE 2: Lower limit of quantitation (LLOQ) was 15.6 ng/mL.
NOTE 3: The geometric mean ratios (GMR) to baseline and confidence intervals were taken from the MMRM model with natural log transformed data using an unstructured variance-covariance matrix structure. Dose group, visit, treatment-by-visit interaction, baseline score, and baseline score-by-visit interaction terms were included in the model as explanatory variables (adjusting for disease progression type as a covariate in the "Overall" analysis only). p-values were obtained using a 2-sample Wilcoxon rank sum test based on the dataset after applying MMRM imputation.
Source: CSR 233AS101 Parts A and B, Table 50, Table 52, Table 55, and Table 57.

2.1.2.4 ニューロフィラメント

101 試験パート B で、CSF 及び血漿中の pNfH 及び NfL を探索的バイオマーカーとして分析した。

ベースライン時のニューロフィラメント濃度は、無作為化前の ALSFRS-R 低下の傾きにより評価した疾患進行速度と相関していた（Figure 6）。

ベースラインから Day 85 までに、血漿中 NfL 濃度は、トフェルセン 20、40、60、及び 100 mg 群でそれぞれ 19%、29%、30%、及び 34%減少し、プラセボ群では 12%増加した（Table 5）［233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Table 14］。トフェルセン 100 mg とプラセボとの差異は、主に急速進行型の部分集団で認められた作用により引き起こされ、急速進行型の部分集団のベースライン時のニューロフィラメント濃度は、その他の部分集団と比べて 3.5 倍以上高かった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Table 9）。

トフェルセン 100 mg では、すべてのアイソフォーム（NfL 及び pNfH）及びマトリックス（血漿及び CSF）で同様の減少が認められた（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Table 11、Table 12、Table 13、及び Table 14）。

ニューロフィラメント濃度の減少は投与終了後（Day 85 後）も持続したが、減少の程度は投与期間中よりも少なかった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Figure 14、Figure 15、Figure 20、及び Figure 21）。

トフェルセン 100 mg 群では、Week 24 のニューロフィラメント濃度が投与期間中（Day 85）に比べて増加していたが、ベースライン時に比べると低値のままであった（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Figure 14、Figure 15、Figure 20、及び Figure 21）。

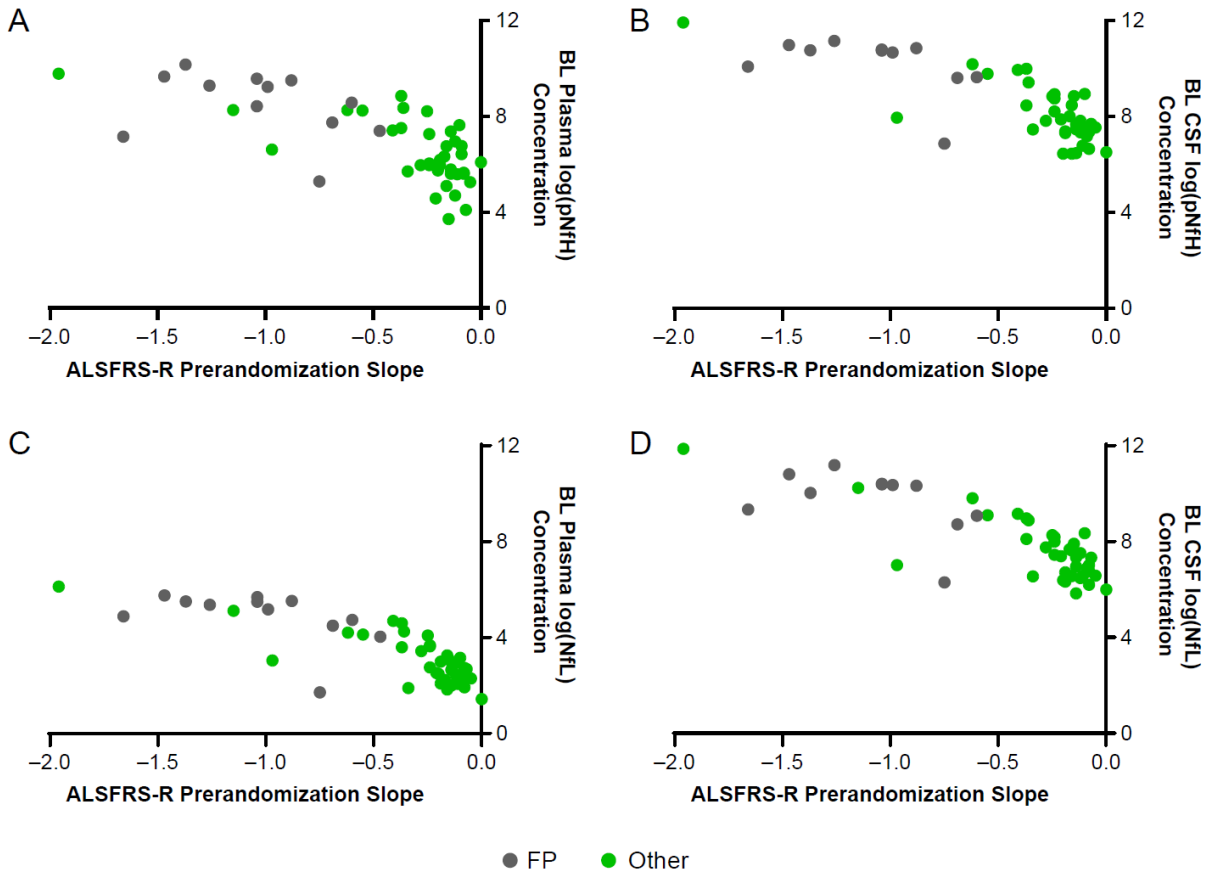
詳細は 233AS101 試験パート A 及び B の CSR の Section 11.2.2.2.4.1 に示す。

Table 5 Study 233AS101 Part B: Summary of Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline in Plasma NfL on Day 85

Population	Parameter	Placebo	100 mg Tofersen
Overall	GMR to baseline (95% CI)	N=12 1.12 (0.95, 1.33)	N=10 0.66 (0.55, 0.79)
	Tofersen: Placebo Differences in GMR (95% CI)		0.59 (0.46, 0.75)
	p-value (Compared to Placebo)	N/A	0.0176
Fast-progressor	GMR (95% CI)	N=4 1.13 (0.66, 1.94)	N=4 0.49 (0.30, 0.80)
	Tofersen: Placebo Differences in GMR (95% CI)		0.43 (0.21, 0.88)
	p-value (Compared to Placebo)	N/A	0.0209

NOTE 1: Baseline was defined as the Day 1 value prior to the study drug. If Day 1 value was missing, the non-missing value (including the Screening Visit) closest to and prior to the first dose was used as the baseline value.
NOTE 2: Lower limit of quantitation (LLOQ) was 0.696 pg/mL for plasma NfL.
NOTE 3: The analysis was based on MMRM model with natural log transformed data using an unstructured variance-covariance matrix structure. Dose group, visit, treatment-by-visit interaction, baseline score, and baseline score-by-visit interaction terms were included in the model as explanatory variables, adjusting for disease progression type as a covariate for “overall” analysis. Nominal p-values were obtained using a 2-sample Wilcoxon rank sum test based on the dataset after applying MMRM imputation.
Source: CSR 233AS101 Parts A and B, Table 74, Table 82, Table 77, and Table 79

Figure 6 Baseline Neurofilament Levels Were Associated with Disease Activity as Measured by Pre-Randomization ALSFRS-R Slope



Source: CSR 233AS101 Parts A and B, Figure 24

2.1.2.5 免疫原性の結果

50 例（トフェルセン投与 38 例及びプラセボ投与 12 例）すべての被験者で血漿中のトフェルセンに対する免疫原性の反応を検討した（233AS101 試験パート A 及び B の CSR、Section 14.12、Output 554）。10 例（26.3%）で治験薬投与後に ADA が発現し、5.3%（38 例中 2 例）はベースライン時に抗トフェルセン抗体陽性であった。これらの被験者は 40 mg 群及び 100 mg 群であり、ベースライン後でも抗トフェルセン抗体陽性となった（ベースライン時と比較して抗体価が 2 倍以上増加したことにより判定）。ベースライン時に陰性であった 40 mg 群の 3 例（33.3%）及びベースライン時に陰性であった 100 mg 群の 5 例（50.0%）が、ベースライン後に 1 回以上陽性となった。

2.1.3 233AS101 試験 ― パート C

101 試験の目標被験者数の検討及びデータの完全性を確保するために実施した方法を「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.1 項及び 1.6.3.2 項に要約した。パート C の統計解析手法の詳細は、「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.4.1 項及び 233AS101 試験パート C の CSR の Appendix 16.1.9、233AS101 試験パート C の SAP 第 [redacted] 版に記載されている。事後に加えた解析の変更は、233AS101 試験パート C

の CSR に記載されている。

101 試験パート C で示されたトフェルセンの CSF 及び血漿中平均 PK は、本試験の SAD 及び MAD での結果に基づき予想される PK とおおむね同様であった。

2.1.3.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果

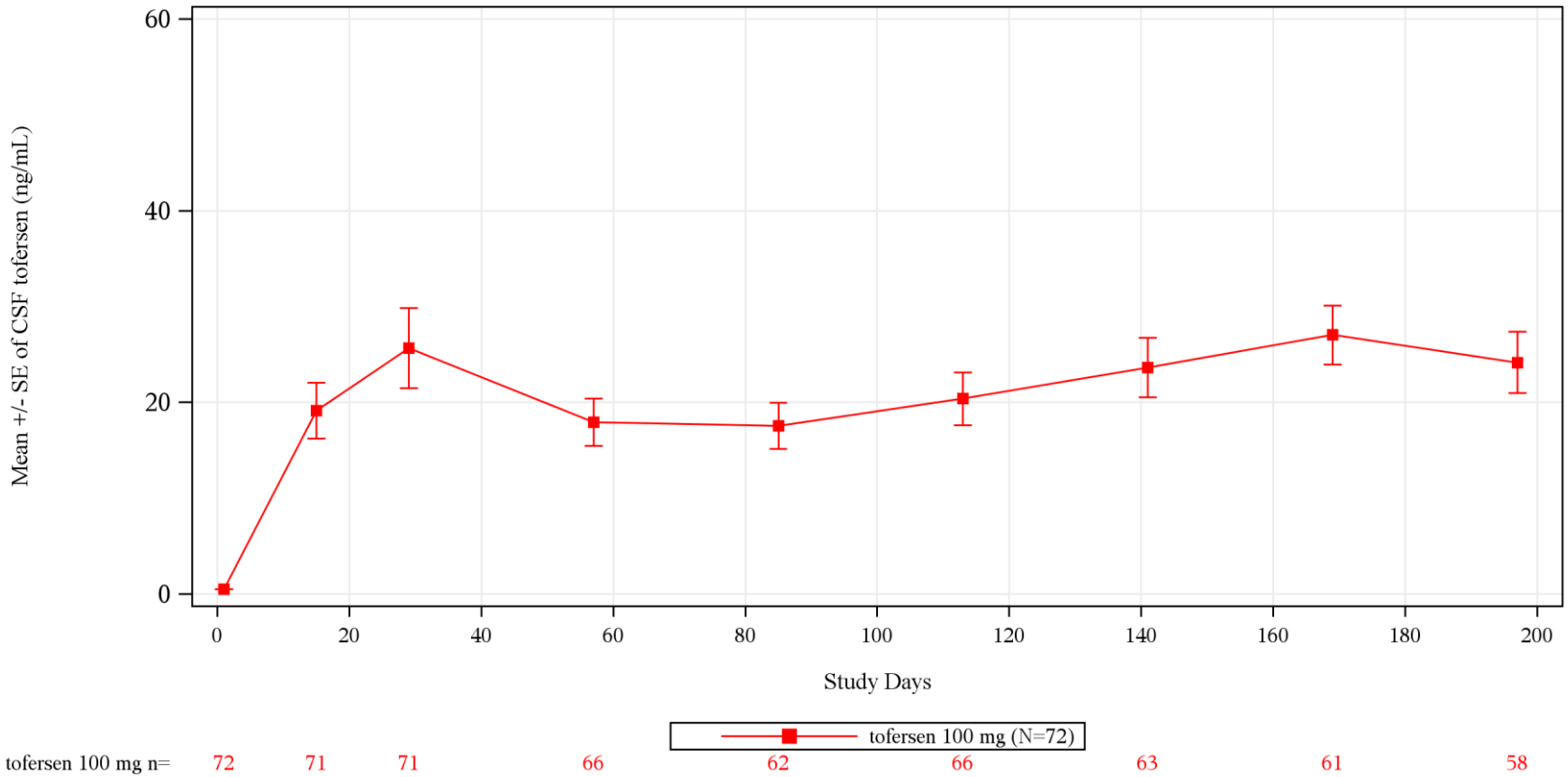
負荷投与期間（2 週間間隔で 3 回投与）直後にトフェルセンの濃度は定常状態に達した［Figure 7］。CSF 中トラフ濃度の最高値は 3 回目投与（負荷投与期間の最終投与）後に認められた。負荷投与期間後に月 1 回投与したときの蓄積はわずかであり、CSF 中トフェルセンの半減期が約 1 ヵ月であることが示された。

CSF 中の濃度プロファイルにおける被験者間及び被験者内の変動は中程度～高度であり、多くの CV が 50%の範囲又は 50%超であった。

エンリッチ集団の CSF 中の平均 PK プロファイルは、「その他」の集団の CSF 中の平均 PK プロファイルに比べて約 2 分の 1 であることが示された（233AS101 試験パート C の CSR、Section 14.3.5.1、Output 19～22）。この差が生じた理由は不明である。注意すべき点は、観察された大きな被験者間変動とは別に、一般にトラフの PK 測定値は不確実性が大きくなりやすいことである（233AS101 試験パート C の CSR、Section 11.4.1.2）。

Figure 7 233AS101 Part C: CSF Tofersen Concentration (ng/mL) Mean Values +/SE by Visit – PK Population

233AS101 Part C: Line plot of CSF tofersen concentration (ng/mL) mean values +/- SE by visit (linear scale) - PK population
Page: 1 of 1



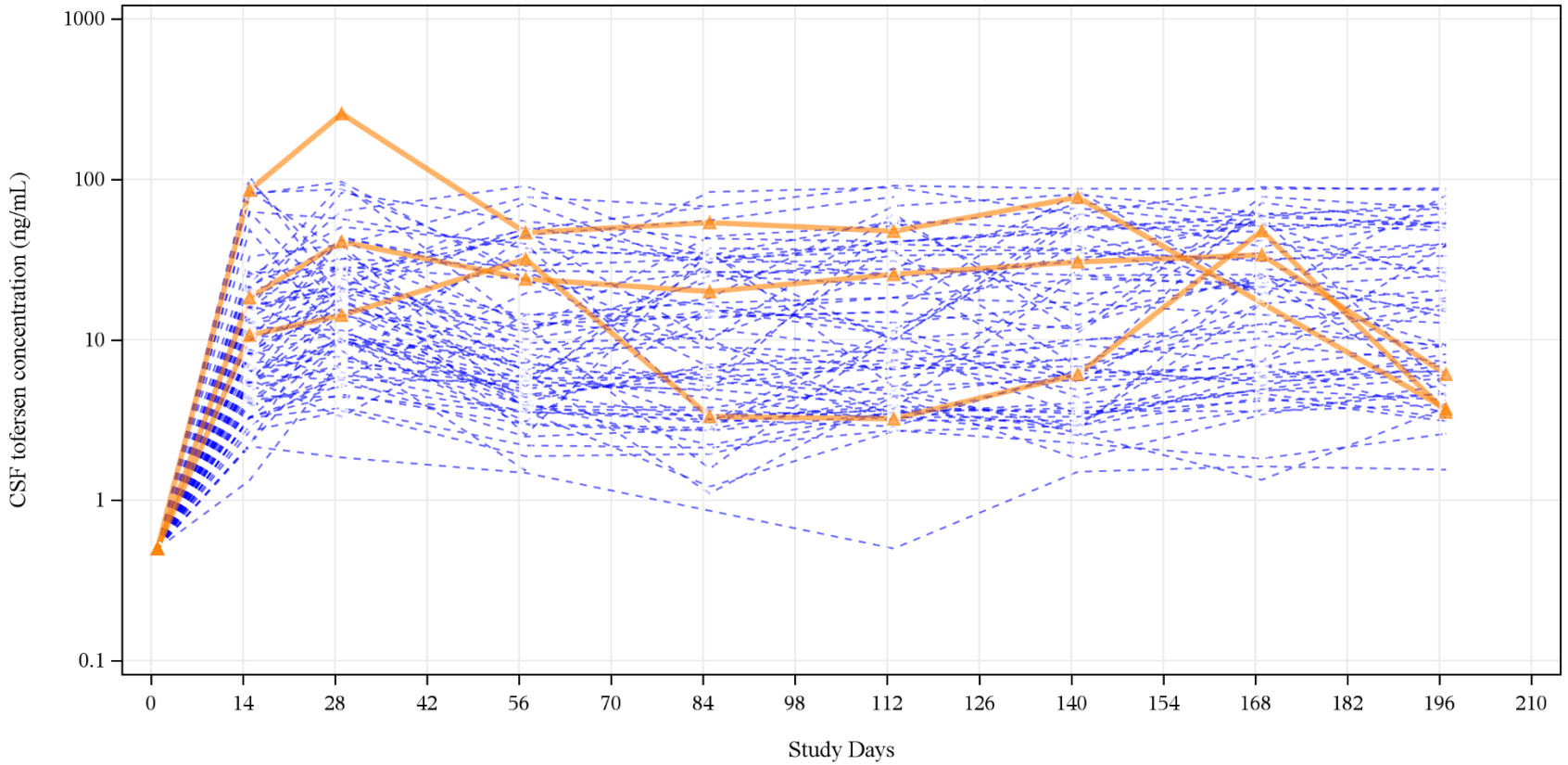
NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations. The sample with concentration > 300 ng/mL is excluded from the summary.
NOTE 2: The mean values presented are arithmetic means.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid.
Source: biib067/233as101-partc/csr/f-pkpd-csf-conc-l-mean-byvis.sas:f-pkpd-csf-conc-l-mean-byvis-all.rtf Run Date: 22SEP2021

101 試験パート C には日本人被験者 7 例（全体の 6.5%）が登録され、3 例にトフェルセン 100 mg が投与された。日本人及び外国人被験者の CSF 中トフェルセン濃度（ng/mL）を Figure 8 に示す。

Figure 8: 233AS101 Part C: Spaghetti Plot of CSF Tofersen Concentration (ng/mL) by Visit (Semilogarithmic Scale) - PK Population

Page: 1 of 2

tofersen 100 mg (N=72 including 3 Japanese participants)



Footnotes are displayed on last page.

Source: biib067/japan/csr/f-pkpd-csf-conc-ss-byvis-pc.sas **Run Date:** 07JUL2022

233AS101 Part C: Spaghetti plot of CSF tofersen concentration (ng/mL) by visit (semilogarithmic scale) - PK population
Page: 2 of 2

NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations. The sample with concentration > 300 ng/mL is excluded from the summary.
NOTE 2: Japanese subjects are colored orange and non-Japanese subjects are colored blue.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid.
Source: biib067/japan/csr/f-pkpd-csf-conc-ss-byvis-pc.sas **Run Date:** 07JUL2022

2.1.3.2 血漿中トフェルセンの薬物動態の結果

SAD 及び MAD 試験で得た結果と同様に、IT 投与したトフェルセンは投与部位（CSF）から CNS 組織及び全身循環に速やかに移行した。Day 1 及び Day 85 にトフェルセン濃度は中央値 4 時間で最高となり、T_{max} は IT ボーラス投与から 1～24 時間後であった（Figure 9）。初回投与と最終投与の AUC 及び C_{max} 値はおおむね同様であった。

予想されたとおり、負荷投与期間後の血漿中への蓄積はわずか又はなかった。血漿中 PK パラメータの要約統計量を Table 6 に示す。

血漿中 PK プロファイルの被験者間変動が大きかった（算出したノンコンパートメント解析パラメータの高い CV%に反映されている［多くの場合、60%を超えていた］）にもかかわらず、パート C から得た結果は、本試験のパート B の 100 mg コホートで算出されたパラメータと同様であった（233AS101 試験パート C の CSR、Section 14.3.5.1、Output 2）。

Table 6 Study 233AS101 Part C: Pharmacokinetic Parameters of Tofersen - PK population

233AS101 Part C: Pharmacokinetic parameters of tofersen - PK population
Page: 1 of 2

	tofersen 100 mg (N=72)
Day 1	
AUC[0-24h] (hour*ng/mL)	
N	22
Mean (SD)	17095.4 (14136.12)
Geometric mean	12001.5
Geometric mean -/+ SE	9758.88, 14759.59
Median	13973.1
Q1, Q3	9821.6, 19660.1
Min, Max	836, 53918
Cmax (ng/mL)	
N	22
Mean (SD)	1134.9 (1032.78)
Geometric mean	731.3
Geometric mean -/+ SE	582.30, 918.48
Median	824.3
Q1, Q3	452.0, 1650.8
Min, Max	57, 4240
Tmax (hours)	
N	22
Mean (SD)	5.0 (4.48)
Geometric mean	4.1
Geometric mean -/+ SE	3.64, 4.70
Median	4.0
Q1, Q3	4.0, 6.0
Min, Max	1, 24

Source: biib067/233as101-partc/csr/t-pkpd-pkparams.sas:t-pkpd-pkparams-all.rtf Run Date: 24SEP2021

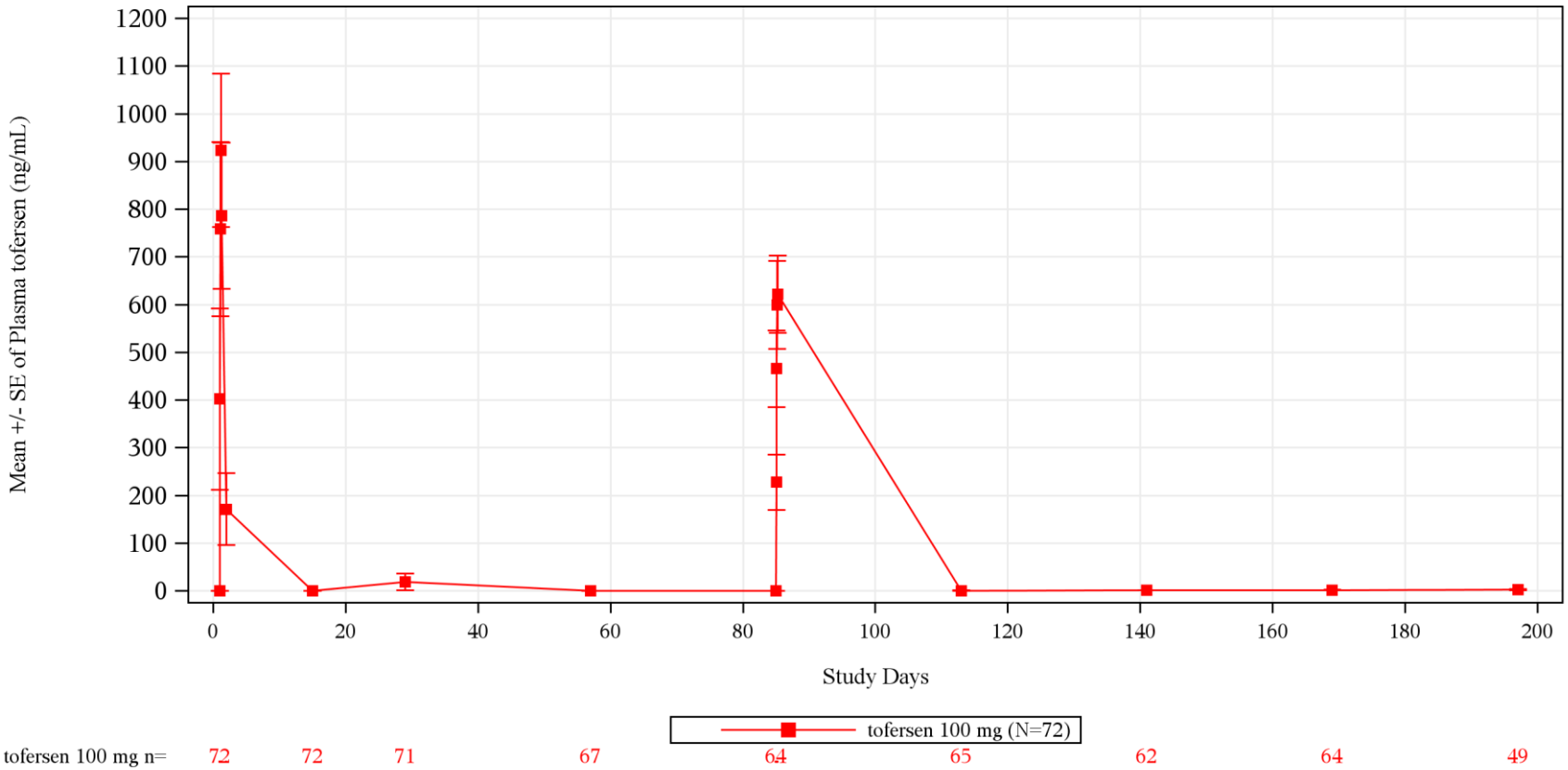
233AS101 Part C: Pharmacokinetic parameters of tofersen - PK population
Page: 2 of 2

	tofersen 100 mg (N=72)
Day 85	
AUC[0-24h] (hour*ng/mL)	
N	19
Mean (SD)	13565.8 (8082.33)
Geometric mean	11259.7
Geometric mean -/+ SE	9688.06, 13086.37
Median	12661.6
Q1, Q3	6654.4, 19631.3
Min, Max	3473, 29604
Cmax (ng/mL)	
N	19
Mean (SD)	704.3 (406.35)
Geometric mean	602.8
Geometric mean -/+ SE	526.75, 689.85
Median	615.2
Q1, Q3	456.7, 903.6
Min, Max	162, 1750
Tmax (hours)	
N	19
Mean (SD)	4.6 (1.61)
Geometric mean	4.2
Geometric mean -/+ SE	3.74, 4.69
Median	4.0
Q1, Q3	4.0, 6.0
Min, Max	1, 6

Source: biib067/233as101-partc/csr/t-pkpd-pkparams.sas:t-pkpd-pkparams-all.rtf Run Date: 24SEP2021

Figure 9 Study 233AS101 Part C: Line Plot of Plasma Tofersen Concentration (ng/ml) Mean Values ± SE by Visit - PK Population

233AS101 Part C: Line plot of plasma tofersen concentration (ng/mL) mean values +/- SE by visit (linear scale) - PK population
Page: 1 of 1



NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: The mean values presented are arithmetic means. The table at the bottom presents the number of subjects with non-missing data at pre-dose timepoints.
Source: biib067/233as101-partc/csr/f-pkpd-pl-conc-ln-mean-byvis.sas:f-pkpd-pl-conc-ln-mean-byvis-all.rtf Run Date: 22SEP2021

日本人集団及び外国人集団におけるトフェルセン 100 mg の初回投与後の血漿中 PK パラメータの要約量を Table 7 に示す。日本人及び外国人被験者の血漿中トフェルセン濃度（ng/mL）を Figure 10 に示す。全体として、日本人集団のパラメータ値は外国人集団の範囲と重複していた。

Table 7 233AS101 Part C: Pharmacokinetic Parameters of Tofersen - PK Population/ Japanese and Non-Japanese Subgroups

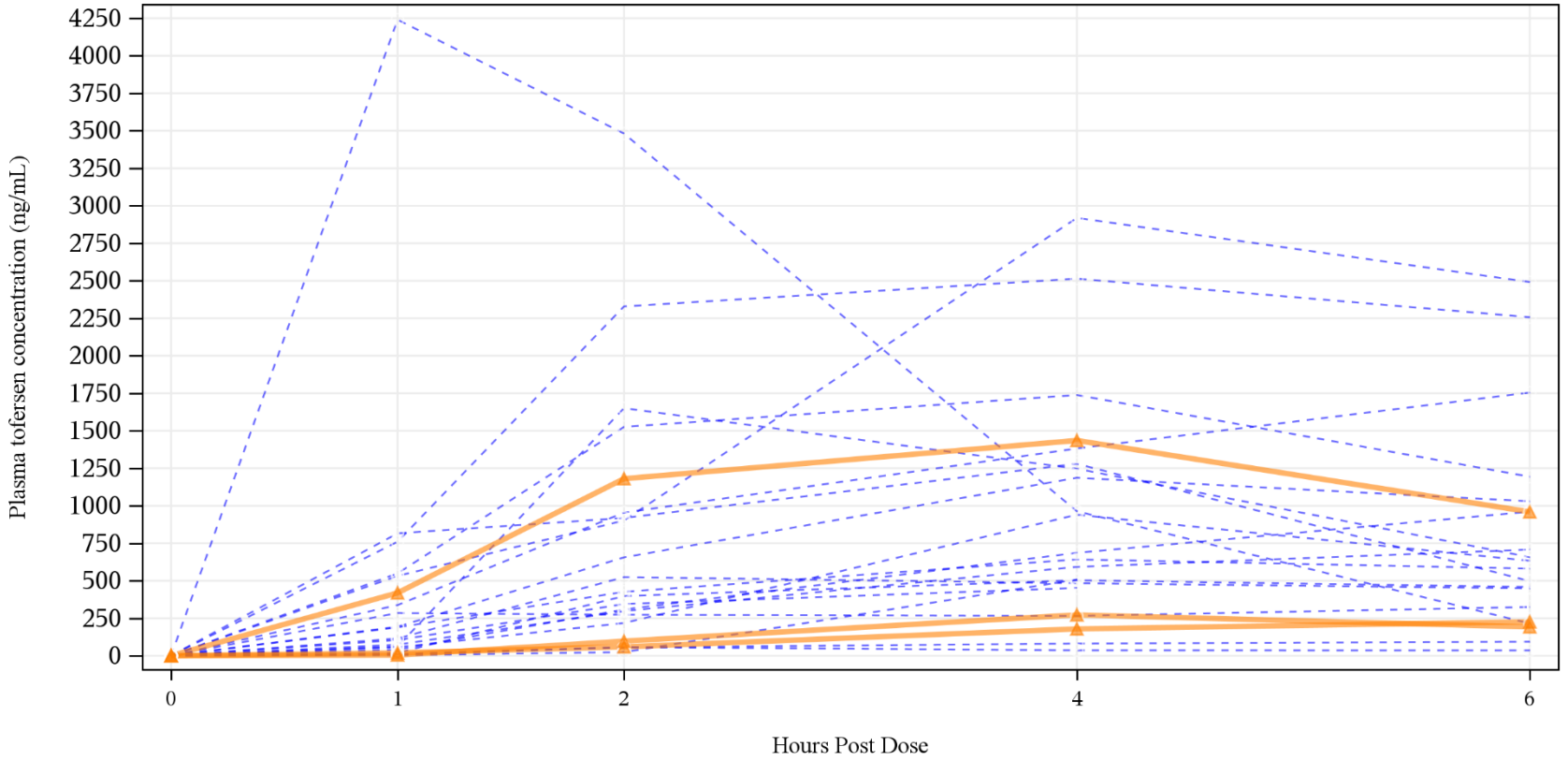
	Japanese tofersen 100 mg (N=3)	**Non-Japanese tofersen 100 mg (N=69)**
Day 1		
AUC[0-24h] (hour*ng/mL)		
N	3	19
Geometric mean	6992.0	13070.3
Geometric CV (%)	75.77	130.21
Median	5358.6	13984.5
Min, Max	4242, 15040	836, 53918
Cmax (ng/mL)		
N	3	19
Geometric mean	462.3	786.2
Geometric CV (%)	129.45	150.45
Median	303.7	940.6
Min, Max	227, 1435	57, 4240
Tmax (hours)		
N	3	19
Geometric mean	8.3	3.7
Geometric CV (%)	119.06	50.41
Median	6.0	4.0
Min, Max	4, 24	1, 6

Source: biib067/japan/csr/t-pkpd-pkparams-jpn-pc.sas Run Date: 14OCT2021, Japan_Analysis_Jul21Cut
Source: biib067/japan/csr/t-pkpd-pkparams-njpn-pc.sas Run Date: 14OCT2021, Japan_Analysis_Jul21Cut

Figure 10 233AS101 Part C: Spaghetti Plot of Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) at Day 1 (Linear Scale) - PK Population

Page: 1 of 1

tofersen 100 mg (N=72 including 3 Japanese participants)



NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculatio ns.
NOTE 2: Japanese subjects are colored orange and non-Japanese subjects are colored blue.
NOTE 3: Only subjects with post-dose assessments are presented.
Source: biib067/japan/csr/f-pkpd-pl-ls-d1-pc.sas **Run Date:** 15JUN2022

2.1.3.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質

- 101 試験パート C では主要な副次評価項目として、ベースラインから Week 28 までの CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度の変化量を評価した。トフェルセン群では両部分集団（mITT 集団及び non-mITT 集団）で、Week 28 時点の CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度の平均値が減少した。プラセボに対するトフェルセンの GMR の差は、mITT 集団で 38%（形式上 $p < 0.0001$）、non-mITT 集団で 26%（形式上 $p < 0.0007$）であった（Table 8 及び Figure 11）。ベースライン時の結果は「2.7.3 臨床的有効性」の Table 8 に示す。
- ITT 集団でも、Week 28 時点でトフェルセン群はプラセボ群に比べて CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度の平均値が減少した（プラセボに対するトフェルセンの GMR の差は 34%、形式上 $p < 0.0001$）［Table 8 及び Figure 11］。
- 101 試験パート B（MAD）で認められたように、CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度は疾患進行の急速性とは独立しており、ベースライン時の濃度及びトフェルセン投与後の減少の程度は、mITT 集団と non-mITT 集団でおおむね類似していた。
- これらの結果はすべての部分集団解析で裏付けられている。mITT、non-mITT、及び ITT 集団の解析では、トフェルセン群での濃度の減少について、性別、症状発現からの罹病期間、発現部位、地理的地域、及びリルゾール又はエダラボンの使用に関して部分集団間に明らかな差は認められなかった。これらの解析の詳細は、233AS101 試験パート C の CSR の Section 11.3.2.1 に示す。

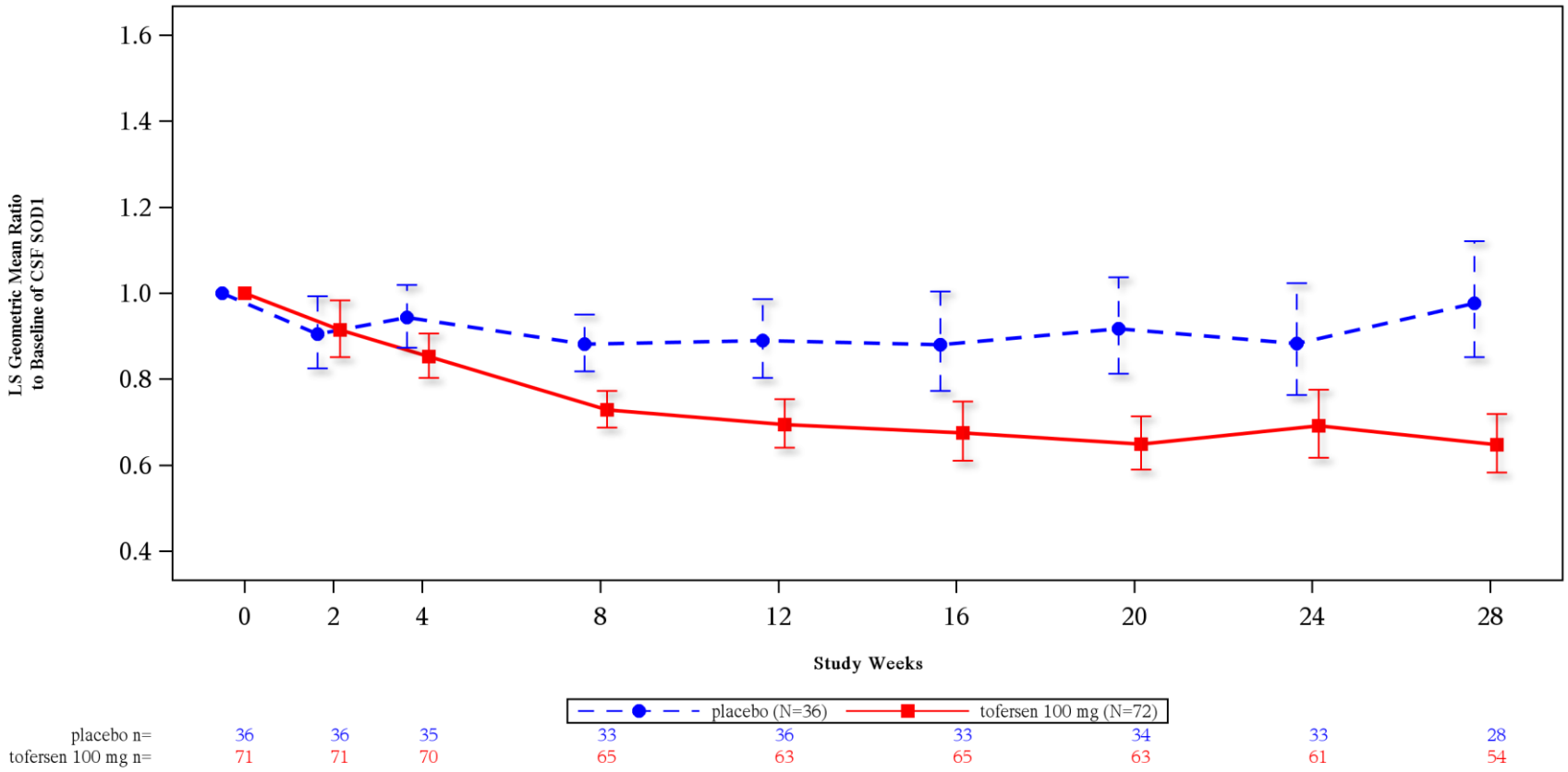
Table 8 Study 233AS101 Part C: Summary of Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline in Total CSF SOD1 Protein on Day 197

		Placebo	Tofersen
mITT	N Adjusted GMR to baseline Tofersen:placebo difference in GMR (95% CI) Nominal p-value (ANCOVA+MI)	21 1.16	39 0.71 0.62 (0.49, 0.78) <0.0001
Non-mITT	N Adjusted GMR to baseline Tofersen:placebo difference in GMR (95% CI) p-value (ANCOVA+MI)	15 0.81	33 0.60 0.74 (0.63, 0.88) 0.0007
ITT	N Adjusted GMR to baseline Tofersen:placebo difference in GMR (95% CI) p-value (ANCOVA+MI)	36 0.98	72 0.65 0.66 (0.57, 0.77) <0.0001

NOTE 1: Baseline was defined as Day 1 value prior to the study drug. If Day 1 value was missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose was used as the baseline value.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) were set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 15.6 ng/mL) in calculations.
NOTE 3: MI was used for missing data. Model included treatment, use of riluzole or edaravone, relevant baseline score and postbaseline values (natural log transformed data). Separate models for mITT and non-mITT were used and combined for ITT analyses.
NOTE 4: Adjusted geometric mean ratios to baseline, treatment differences in adjusted geometric mean ratios to baseline and corresponding 95% CIs and nominal p-values were obtained from the ANCOVA model for change from baseline including treatment as a fixed effect and adjusting for the following covariates: baseline disease duration since symptom onset, relevant baseline score, and use of riluzole or edaravone. The analysis was based on natural log transformed data.
Sources: CSR 233AS101 Part C, Table 22 and Section 14.3.4.1, Output 6.

Figure 11 233AS101 Part C: Line Plot of Total CSF SOD1 Protein Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline Values (95% CI) by Visit from ANCOVA Analysis Using MI – ITT Population

233AS101 Part C: Secondary endpoint exploratory analysis: Line plot of total CSF SOD1 protein LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by visit from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 1 of 2



Footnotes are displayed on last page.
Source: biib067/233as101-partc/csr/f-pkpd-sod-gm-anc-mi-itt-byvis.sas Run Date: 11NOV2021

233AS101 Part C: Secondary endpoint exploratory analysis: Line plot of total CSF SOD1 protein LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by visit from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 2 of 2

NOTE 1: Baseline is defined as day 1 value prior to the study drug. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 15.6 ng/mL) in calculations. Multiple imputation is used for missing data.
NOTE 3: The analysis is based on ANCOVA model with natural log transformed data. The model includes covariates for the corresponding baseline value i.e. log value, baseline disease duration since symptom onset, and use of riluzole or edaravone. The analysis is based on the combined MI datasets from the mITT and non mITT populations.
NOTE 4: The table at the bottom presents the number of subjects with observed non-missing data at each visit.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid; SOD1 = superoxide dismutase 1; ANCOVA = analysis of covariance; MI = multiple imputation; LS = least square.
Source: biib067/233as101-partc/csr/f-pkpd-sod-gm-anc-mi-itt-byvis.sas Run Date: 11NOV2021

2.1.3.4 脱アミド化 SOD1

CSF 中の脱アミド化 SOD1 ペプチドは、ITT 集団では Week 16（Day 113）までに、トフェルセン群で 37%減少（ベースラインに対する GMR）した。プラセボ群では 2%増加した（Integrated Summary of Efficacy［ISE］, Appendix 3.3.1 SOD1 and Deamidated SOD1、Output 22）。

追加解析の結果を ISE, Appendix 3.3.1 SOD1 and Deamidated SOD1、Output 17～36 に示す。

2.1.3.5 ニューロフィラメント

101 試験パート C では、体液採取の容易さと、CSF 中 NfL アッセイよりも先に血漿中 NfL アッセイの分析バリデーションが行われたことなどの実施上の理由から、主要な副次評価項目として CSF 中 NfL よりも血漿中 NfL を優先した。CSF 中 NfL 及び血漿／CSF 中 pNfH も探索的評価項目として評価した。

- ベースライン時の血漿中 NfL 濃度は、進行がより急速な mITT 集団の方が non-mITT 集団よりも高かった（233AS101 試験パート C の CSR、Table 13）。
- 血漿中 NfL は Week 16 頃まで低下し、その後は低下が維持された。Week 28 で、両部分集団で平均血漿中 NfL 濃度の低下が認められた。プラセボに対するトフェルセンの GMR の差は、mITT 集団で 67%（形式上 $p < 0.0001$）、non-mITT 集団で 48%（形式上 $p < 0.0001$）であった（Figure 12 及び Table 9）。
- ITT 集団でも、Week 28 でトフェルセン群はプラセボ群に比べて血漿中 NfL 濃度が低下した（プラセボに対するトフェルセンの GMR の差は 60%、事後の形式上 $p < 0.0001$）（Table 9）。
- これらの結果はすべての部分集団解析で示された傾向により裏付けられている。解析では、性別、症状発現からの罹病期間、発現部位、地理的地域、及びリルゾール又はエダラボンの使用に関して部分集団間に明らかな差は認められなかった。これらの解析の詳細は、233AS101 試験パート C の CSR の Section 11.3.2.2 に示す。

ニューロフィラメントの低下は、101 試験パート C のトフェルセン群のほぼ全例に認められた（Figure 13）。トフェルセンを支持する同様の低下が、すべてのマトリックス（CSF 及び血漿）及びアイソフォーム（NfL 及び pNfH）で認められた（Figure 14 及び Figure 15）。これら追加の解析の詳細は、233AS101 試験パート C の CSR の Section 11.3.2.2、Section 11.3.3.1、及び Section 11.3.3.2 に示す。

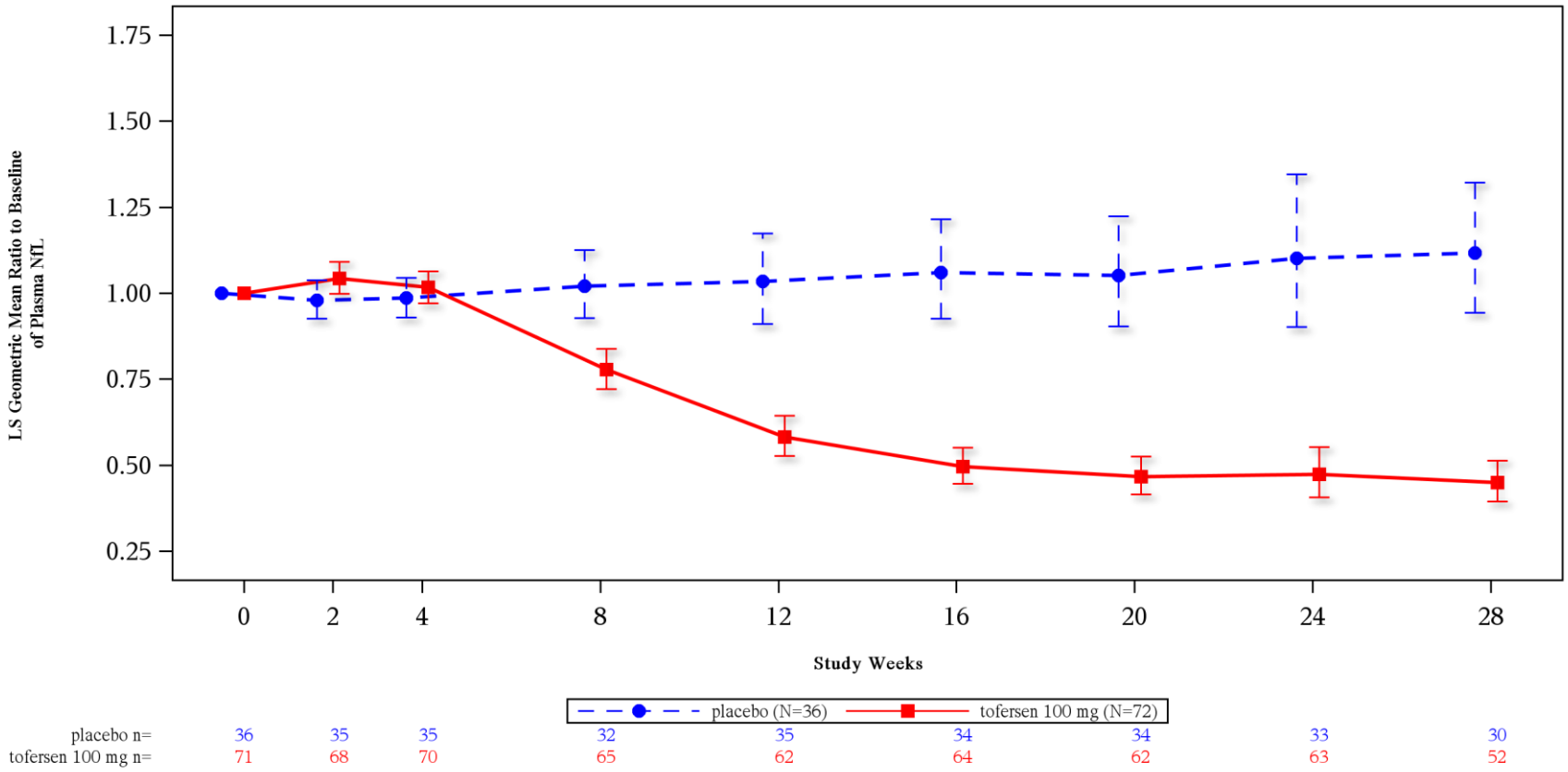
Table 9 Study 233AS101 Part C: Summary of Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline in Plasma NfL on Day 197

		Placebo	Tofersen
mITT	N Adjusted GMR to baseline Tof:plac difference in GMR (95% CI) Nominal p-value (ANCOVA+MI)	 21 1.20	39 0.40 0.33 (0.25, 0.45) <0.0001
Non-mITT	N Adjusted GMR to baseline Tof:plac difference in GMR (95% CI) Nominal p-value (ANCOVA + MI)	15 0.95	33 0.50 0.52 (0.43, 0.63) <0.0001
ITT	N Adjusted GMR to baseline Tof:plac difference in GMR (95% CI) Nominal p-value (ANCOVA+MI)	36 1.12	72 0.45 0.40 (0.33, 0.49) <0.0001

NOTE 1: Baseline was defined as Day 1 value prior to the study drug. If Day 1 value was missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose was used as the baseline value.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) were set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 4.9 pg/mL) in calculations.
NOTE 3: MI was used for missing data. Model included treatment, use of riluzole or edaravone, relevant baseline score and postbaseline values (natural log transformed data). Separate models for mITT and non-mITT were used and combined for ITT analyses.
NOTE 4: Adjusted geometric mean ratios to baseline, treatment differences in adjusted geometric mean ratios to baseline and corresponding 95% CIs and nominal p-values were obtained from the ANCOVA model for change from baseline including treatment as a fixed effect and adjusting for the following covariates: baseline disease duration since symptom onset, relevant baseline score, and use of riluzole or edaravone. The analysis was based on natural log transformed data.
Sources: CSR 233AS101 Part C Table 23 and Section 14.3.4.2, Outputs 3

Figure 12 233AS101 Part C: Line Plot of Plasma NfL Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline Values (95% CI) by Visit from ANCOVA Analysis Using MI – ITT Population

233AS101 Part C: Secondary endpoint exploratory analysis: Line plot of plasma NfL LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by visit from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 1 of 2

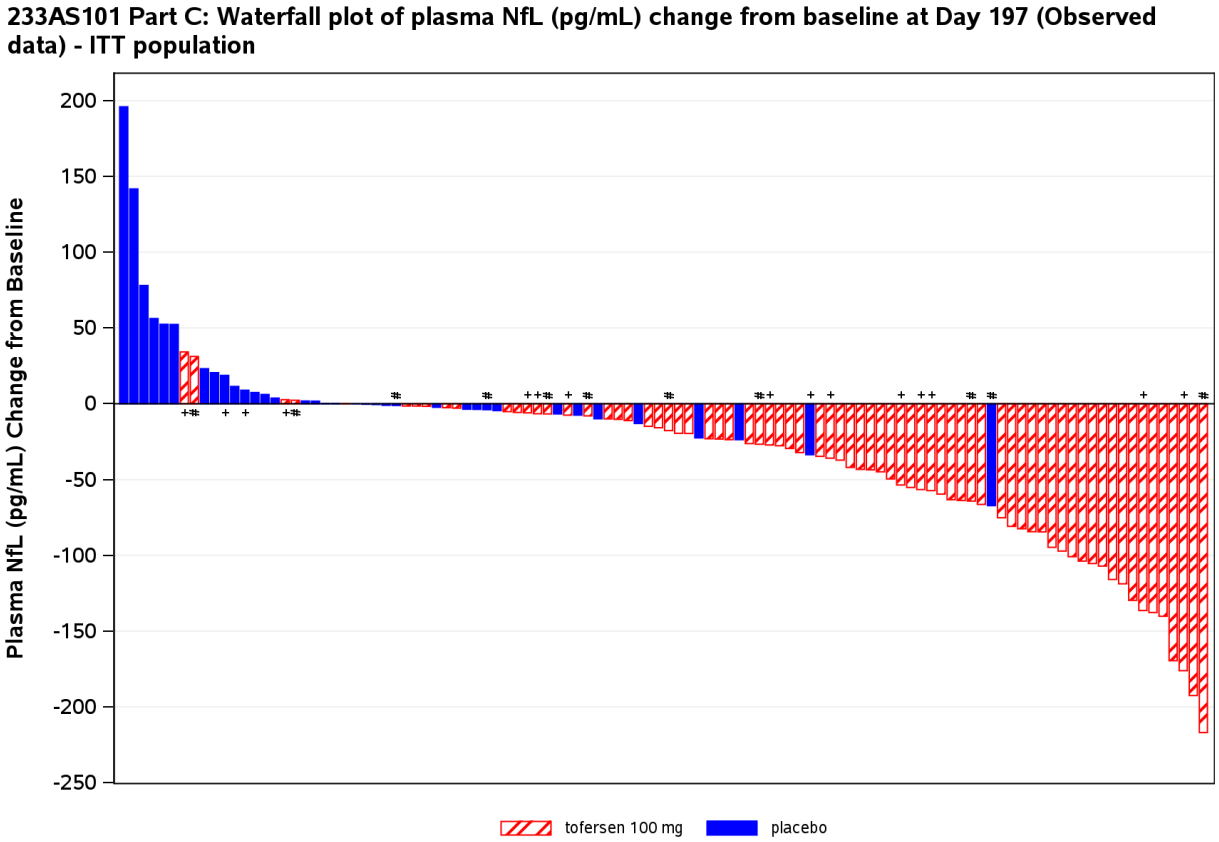


Footnotes are displayed on last page.
Source: biib067/233as101-partc/csr/f-pkpd-pnfl-ancmi-itt-byvis.sas Run Date: 11NOV2021

233AS101 Part C: Secondary endpoint exploratory analysis: Line plot of plasma NfL LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by visit from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 2 of 2

NOTE 1: Baseline is defined as day 1 value prior to the study drug. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 4.9 pg/mL) in calculations. Multiple imputation is used for missing data.
NOTE 3: The analysis is based on ANCOVA model with natural log transformed data. The model includes covariates for the corresponding baseline value i.e. log value, baseline disease duration since symptom onset, and use of riluzole or edaravone. The analysis is based on the combined MI datasets from the mITT and non mITT populations.
NOTE 4: The table at the bottom presents the number of subjects with observed non-missing data at each visit.
Abbreviations: NfL = neurofilament light chain; ANCOVA = analysis of covariance; MI = multiple imputation; LS = least square.
Source: biib067/233as101-partc/csr/f-pkpd-pnfl-ancmi-itt-byvis.sas Run Date: 11NOV2021

Figure 13: Study 233AS101 Part C: Waterfall Plot of Plasma NfL Absolute Change From Baseline at Week 28 (Observed Data) - ITT Population



NOTE 1: Observed data are presented. For the subject ([redacted]) without baseline plasma NfL, the Day 15 value is used as baseline to calculate the change from baseline. For completers with Day 197 data available, change from baseline at Day 197 is presented. For completers with missing Day 197 data, the last available plasma NfL assessment is presented with +. For deaths and withdrawals, the last available plasma NfL assessment is presented with #.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 4.9 pg/mL) in calculations.
Abbreviations: NfL = neurofilament light chain.
SOURCE: BIIB067/ISE/ISE-BLA2-GLOBAL/F-PKPD-PNFL-CHG-WFALL.SAS Run date: 30SEP2022

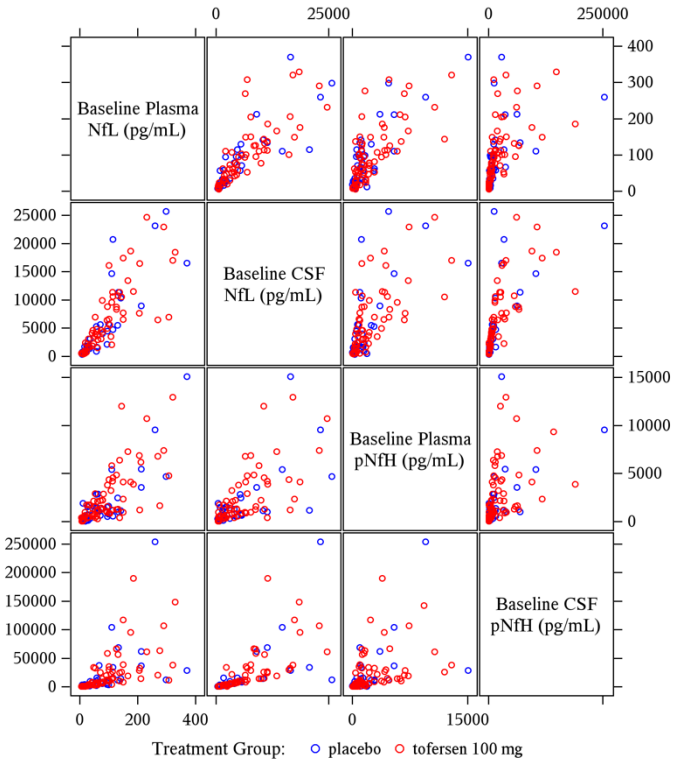
2.1.3.5.1 ニューロフィラメントのマトリックス（CSF 及び血漿）とアイソフォーム（NfL 及び pNfH）との関係

トフェルセン投与により、すべてのマトリックス（CSF 及び血漿）及びアイソフォーム（NfL 及び pNfH）で同様の低下が示唆されている（Figure 14 及び Figure 15）。トフェルセン群では、Spearman の相関係数で、ベースラインから Week 16 までの血漿中 NfL、CSF 中 NfL、血漿中 pNfH、及び CSF 中 pNfH の変化量の間に強い相関が示されており（0.74～0.90 の相関）、これは対応するベースライン時の相関と同様である（0.68～0.91 の相関）。プラセボ群では、ベースライン時ではすべてのマトリックス及びアイソフォームで相関が強かったが（0.57～0.91）、Week 16 までに弱くなった（0.32～0.72）［ISE, Appendix 3.3.2 NfL and Combined NfL and NfH、Output 26 及び 27］。

これらのデータは、ニューロフィラメント（よく知られた軸索損傷及び神経変性の指標）により測定した ALS 患者の基礎疾患活動性に対するトフェルセンの影響を強く示すものである。

Figure 14 233AS101 Part C: Matrix Plot of Baseline Plasma NfL, Baseline CSF NfL, Baseline Plasma pNfH, and Baseline CSF pNfH- ITT Population

233AS101 Part C: Matrix plot of baseline plasma NfL, baseline CSF NfL, baseline plasma pNfH, and baseline CSF pNfH- ITT population
Page: 1 of 1

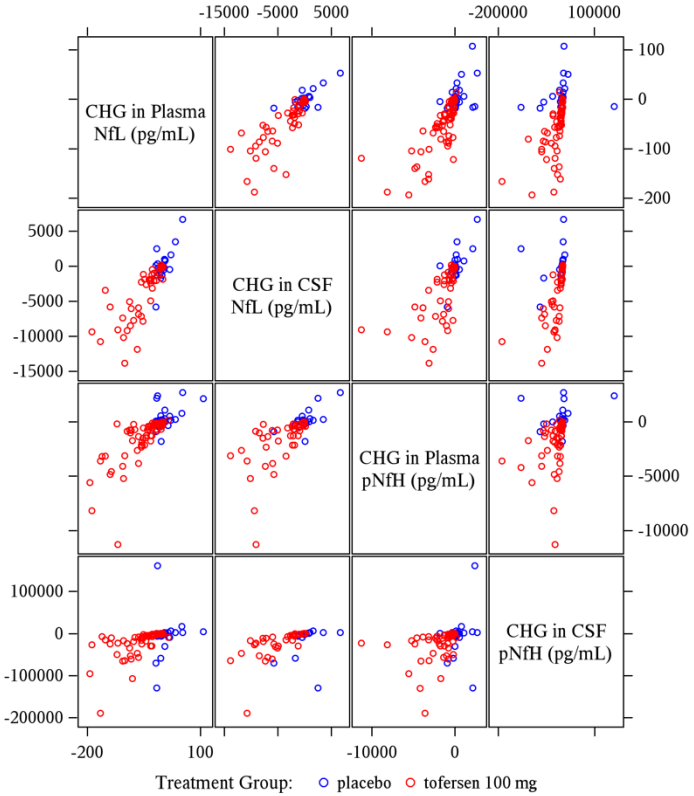


NOTE 1: Baseline is defined as day 1 value prior to the study drug. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.
Abbreviations: CSF = Cerebral spinal fluid; NfL = Neurofilament light chain; pNfH = Phosphorylated neurofilament heavy chain.
Source: biib067/ise/ise-bla2/f-matrix-plot-baseline.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 20APR2022

Figure 15 Study 101 Part C: Matrix Plot of Change from Baseline at Week 16 for Plasma NfL, CSF NfL, Plasma pNfH, and CSF pNfH- ITT Population

233AS101 Part C: Matrix plot of change from baseline at Day 113 for plasma NfL, CSF NfL, plasma pNfH, and CSF pNfH - ITT population

Page: 1 of 1



NOTE 1: Baseline is defined as day 1 value prior to the study drug. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.

Abbreviations: CSF = Cerebral spinal fluid; NfL = Neurofilament light chain; pNfH = Phosphorylated neurofilament heavy chain; CHG = Change.

Source: biib067/ise/ise-bla2/f-matrix-plot-chg.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 20APR2022

2.1.3.5.2 統計的モデルに基づく NfL と臨床機能／生存との関係

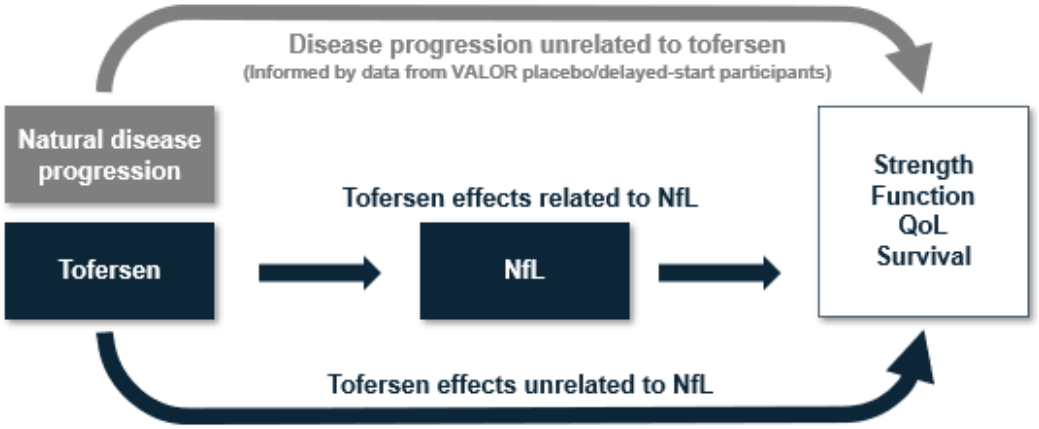
トフェルセン投与によるニューロフィラメントの減少は、SOD1 タンパク質の減少後、Week 16 頃までに減少が最下点となった（Figure 12 及び Figure 30）。このようなニューロフィラメントの減少は、筋力、機能、及び生活の質（QoL）の低下に緩徐化が認められ、死亡に相当するイベントのリスクが軽減される前に生じている。（これらの緩徐化は Week 52 までは明らかではなかった）（「2.7.3 臨床的有効性」）。ニューロフィラメントの減少は、101 試験パート C のトフェルセン群のほぼすべての被験者にみられた（Figure 13）。

トフェルセン投与によるニューロフィラメントの減少と臨床的ベネフィットの関連性をさらに評価する目的で、統計学的因果推論モデルを開発した。特にこのモデルは、ITT 集団を対象として、Week 16 時点でのトフェルセン投与による血漿中 NfL 濃度の低下と、Week 28 時点での各種臨床評価項目（ALSFRS-R、SVC、HHD、ALSAQ-5、及び EQ-5D-5L utility score）の進行緩徐化及び生存の評価項目との関連性を明らかにしている。統計的モデルの重要な構成要素の 1 つとして、プラセボ群の被験者から得たデータを用い、トフェルセンを投与した被験者での反実仮想的な自然な疾患進行を推定した。このことから、本モデルを用いることにより、被験者間で異なる自然な疾患進行速度を説明することができた（例：ベースラインのニューロフィラメント濃度が高い被験者はベースラインの濃度が低い被験者に比べて、試験期間中の機能喪失が大きいと予想される）。統計モデルの詳細を付録 1 に示す。

統計的モデルの基礎となる概念を Figure 16 に示す。仮にトフェルセン群の被験者にプラセボが投与されていたとすると、それらの被験者は、プラセボのデータから推定可能な自然な疾患進行の経過であったと考えられる。トフェルセン群の被験者の疾患進行の道程は、潜在的な薬物の影響によって変化することが考えられる。こうして、本モデルでは、トフェルセン群の被験者で観察された治療効果を以下の 3 つの要素に分解した。

1) 自然な疾患進行による反事実的な変化
   101 試験パート C の投与開始遅延群のデータを用いて以下のとおり推定した。
   a. Week 28 の機能／筋力／QoL の評価項目の解析では、101 試験パート C のプラセボ群の被験者のデータを用いて、自然な疾患進行によるこれら評価項目の低下を推定した。
   b.生存関連イベントの解析では、投与開始遅延群のデータを用いて、自然な疾患進行によるイベントが発現するリスクを保守的に推定した。
2) NfL 経路を介したトフェルセンの効果による変化
3) バイオマーカー以外の経路／因子を介したトフェルセンの効果による変化

Figure 16: Statistical Model Framework



具体的には、このモデルでは、トフェルセンの投与を受けた被験者のベースライン時の NfL 濃度を用いて、これら被験者がトフェルセンの投与を受けなかった場合の Week 16 の NfL 濃度を推定した。これらの値を用いて、トフェルセンが投与されなかった場合の Week 28 での筋力、機能、及び QoL の評価、ならびに長期間での生存関連イベントを予測した。これにより、トフェルセン投与時に観察された疾患進行の程度と投与されなかった場合に予測される疾患進行の程度を比較し、トフェルセンによる血漿中 NfL 濃度の低下に関連する疾患進行の緩徐化の程度又は生存関連イベントのリスク低下の程度が推定可能となった。

2.1.3.5.2.1 NfL 低下と筋力、機能、及び QoL 低下の緩徐化との関連

本モデルは、早期（Week 16）のトフェルセンによるニューロフィラメントの低下と Week 28 におけるすべての臨床評価項目の悪化の減少との関連を示す（Table 10）。

ALSFRS-R については、モデルからベースライン時の血漿中 NfL 濃度の平均値（約 97 pg/mL）の被験者が Week 16 で血漿中 NfL 濃度が 10 pg/mL 低下すると、Week 28 に ALSFRS-R の低下が平均で約 0.8 ポイント減少することが示唆された。NfL 濃度が 60%低下すると、トフェルセンを投与しない場合と比較して Week 28 の ALSFRS-R の低下が約 4.5 ポイント減少する。本解析の p 値（0.0038）は、自然の疾患進行及びニューロフィラメント以外の経路を介した本剤の効果で調整した場合の関連性の強さを反映している。

この関係は動的であり、ベースライン時の NfL 濃度が高く、疾患進行が速い被験者では差が大きくなり、自然な疾患進行との違いを示す機会が多くなると考えられる。

このモデルをトフェルセンのデータセットに適用する（Table 12）ことで、トフェルセンを投与された被験者がトフェルセンを投与されなかったとした場合の予測が可能であり、ベースライン時の血漿中 NfL 濃度の投与群間での不均衡の説明が可能である。このモデルから 101 試験パート C でトフェルセン群に割り付けられた被験者（72 例）がプラセボ群に割り付けられていたら、実際にプラセボ群に割り付けられた被験者よりも疾患進行が速く、28 週間で ALSFRS-R の低下が平均 3.83 ポイント大きく、SVC%予測値の低下が 10.60%大きく、HHD メガスコアの低下が 0.12 ポイント大きく、ALSAQ-5 合計スコアの低下が-7.74 ポイント大きく、EQ-5D-5L utility

score が 0.17 ポイント大きくなっていたことが示された。

28 週間にわたるトフェルセン投与により NfL の低下の程度が大きくなったことに基づくと、本モデルは、これに対応した臨床機能の悪化が緩徐化すること示している（Table 13）。

追加のデータは、ISE, Appendix 3.3.3 NfL Modeling、Output 21～35 に示す。

Table 10　Relationship Between Tofersen-Driven Reductions in Plasma NfL at Week 16 and Slowing of Decline in Function, Strength, and QoL at Week 28

Clinical Outcome Measure	Reduction in Worsening with Tofersen (Versus Untreated) Per 10 Unit of NfL Lowering [a]
ALSFRS-R Total Score	0.772 (p=0.0038)
Percent-Predicted SVC	1.451 (p=0.0706)
HHD Overall Megascore	0.029 (p=0.1303)
ALSAQ-5 Total Score	2.194 (p=0.0056)
EQ-5D-5L Utility Score	0.017 (p=0.0894)

[a] Reflects relationship at sample mean baseline plasma NfL (96.78 pg/mL).
Sources: ISE Appendix 3.3.3 NfL Modeling, Output 6 to10.

2.1.3.5.2.2　NfL の低下と無イベント期間／生存期間との関係

また、このモデルにより、Week 16 時点でのトフェルセンによる血漿中 NfL 濃度の低下と、無イベント期間／生存期間との間に明らかな関連性が認められた（Table 11）。

このモデルでは、ベースライン時の血漿中 NfL 濃度の平均値（ITT 集団で 96.78 pg/mL）の被験者では、血漿中 NfL 濃度が 10 pg/mL 低下すると、4 つの生存の評価項目においてリスクが 16.1%～24.9%低下することを示している。これまでに観察されたイベント数は限られているが、いずれの評価項目でも一貫してニューロフィラメントの低下がイベントのリスクの低下と関連する結果であった。

この統計モデルは、トフェルセンによる早期（Week 16）での血漿中 NfL 濃度の低下が、無イベント期間及び生存期間の延長と直接的に関連していることついても裏付けている。

追加データについては、ISE Appendix 3.3.3 NfL Modeling, Output 36～Output 43 に示す。

Table 11 Relationship Between Reduction in Plasma NfL and Reduction in Event Risk Due to Tofersen Treatment

Survival Endpoints	Tofersen Effect Through Biomarker	Percent Reduction in Event Risk With Tofersen Relative to 10 Unit of NfL Lowering [a]
Time to Death	0.0175 (p=0.3690)	16.1
Time to Death or PV	0.0224 (p=0.1119)	20.1
Time to Death, PV, or Withdrawal Due to Disease Progression	0.0287 (p=0.0100)	24.9
Time to Death With Additional Vital Status	0.0284 (p=0.0318)	24.7

[a] Reflects relationship at sample mean baseline plasma NfL (96.78 pg/mL).

Sources: ISE Appendix 3.3.3 NfL Modeling, Outputs 36 to 39.

Table 12 Study 233AS101 Part C: Observed Mean Change From Baseline Tofersen Treated Participants Versus Model-Predicted Mean Change from Baseline to Week 28 Without Treatment (Assumed Sample Mean Baseline NfL = 96.78 pg/mL)

Clinical outcome measure	Population	Tofersen-treated participants		Difference favoring tofersen treatment
		Observed (mean) change from baseline to Week 28	Predicted (mean) change from baseline to Week 28 without treatment	
ALSFRS-R	ITT	-3.60	-7.43	3.83
	Fast progressors (≥ median NfL)	-6.27	-11.96	5.69
SVC percent predicted	ITT	-5.75	-16.35	10.60
	Fast progressors (≥ median NfL)	-10.33	-26.00	15.66
HHD megascore	ITT	-0.23	-0.35	0.12
	Fast progressors (≥ median NfL)	-0.35	-0.60	0.25
ALSAQ-5 total score	ITT	6.56	14.29	-7.74
	Fast progressors (≥ median NfL)	10.78	24.13	-13.35
EQ-5D-5L utility score	ITT	-0.07	-0.24	0.17
	Fast progressors (≥ median NfL)	-0.13	-0.39	0.26

Source: ISE Appendix 3.3.3 NfL Modeling, Output 1 to5

Table 13 Study 233AS101 Part C: Reduction in Worsening on Clinical Function at 28 Weeks with Tofersen Treatment Versus Reduction in Plasma NfL with Tofersen Treatment

			Reduction in NfL over 28 weeks					
Clinical Outcome	Gamma	Lambda	60%	50%	40%	35%	30%	20%
ALSFRS-R total score	-0.0772	-1.2693	3.21	2.47	1.72	1.34	0.97	0.22
SVC percent predicted	-0.1451	0.1585	8.58	7.18	5.77	5.07	4.37	2.97
HHD megascore	-0.0029	-0.0861	0.08	0.05	0.03	0.01	0.00	-0.03
ALSAQ-5 total score	0.2194	5.2246	7.51	5.39	3.27	2.21	1.14	-0.98
EQ-5D-5L utility score	-0.0017	0.0547	0.15	0.14	0.12	0.11	0.10	0.09

Note: Results are shown for sample mean baseline plasma NfL (96.78 pg/mL) for completers.
Source: ISE Appendix 3.3.3 NfL Modeling, Outputs 11 to 15

2.1.3.6 免疫原性の結果

ADA 評価用にベースライン後の血漿試料を採取した 108 例（トフェルセン投与 72 例及びプラセボ投与 36 例）を対象に、血漿中のトフェルセンに対する免疫原性の反応を評価した。

全体で、2 例（2.8%）がトフェルセンの初回投与前に ADA 陽性と判定された。トフェルセンを投与した被験者のうち 22 例（30.6%）で治験薬投与後に ADA の発現が認められ、このうち 19 例の ADA 陽性被験者は持続性の反応（初回の陽性判定時点後の評価可能なデータのうち、112 日以上経過してから 2 回以上又は 112 日未満のうちに 1 回以上、ベースライン後の陽性判定があることと定義）と判断された。残りの 3 例の ADA 陽性被験者は一過性の反応（ベースライン後の陽性判定時点が 1 回のみであり、その後 112 日以上陰性であること、又はベースライン後 112 日未満のうちに 2 回以上陽性判定の時点があり、その後、初回の陽性判定から 112 日以上経過してから得た試料が陰性であることと定義）と判断された（101 試験パート C の CSR、Table 43）。

2.1.4 233AS102 試験の結果

102 試験では 2 回の中間解析（データカット日は 2021 年 7 月 16 日及び 2022 年 1 月 16 日）を実施した。記載した結果は 2022 年 1 月 16 日のデータカット日の中間解析に基づくものである。

先行試験である 101 試験パート A、B、及び C でのトフェルセンの曝露量が異なるため、102 試験の被験者から得た PK 及び PD パラメータは、233AS102 試験の SAP 第 [redacted] 版及び第 [redacted] 版に示す試験集団に基づいて解析した。主要な解析は、先行試験の 101 試験パート C に登録された被験者（以下「102 試験におけるパート C の被験者」）で実施したが、101 試験パート A 及び B に登録された被験者（以下「102 試験におけるパート A 及び B の被験者」）についても、実測データを評価した。また、102 試験におけるパート C の被験者では、PK 及び PD／バイオマーカーの評価項目の解析を疾患進行の部分集団（101 試験パート C で急速な疾患進行に関する予後エンリッチメント基準を満たした部分集団［解析では「エンリッチ」と表示］及び 101 試験パート C のその他の適格な被験者［「その他」と表示］）別に示した。

102 試験の目標被験者数の検討及びデータの完全性を確保するために実施した方法を「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.1 項及び 1.6.3.2 項に要約した。統計解析手法の詳細は「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.4.3 項に記載されている。事後に加えた解析の変更は、233AS102 試験の CSR の第 1 回中間報告書（Interim 1）及び 233AS102 試験の CSR の第 2 回中間報告書（Interim 2）に記載されている。

2.1.4.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態

2022 年 1 月 16 日の中間データカット時点で、負荷投与期間中及びその直後の初期の濃度上昇後、CSF 中トフェルセンのトラフ濃度は定常状態で安定し、残りの投与期間中は維持されていた（Figure 17 及び 233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 11.4.1.1.1）。

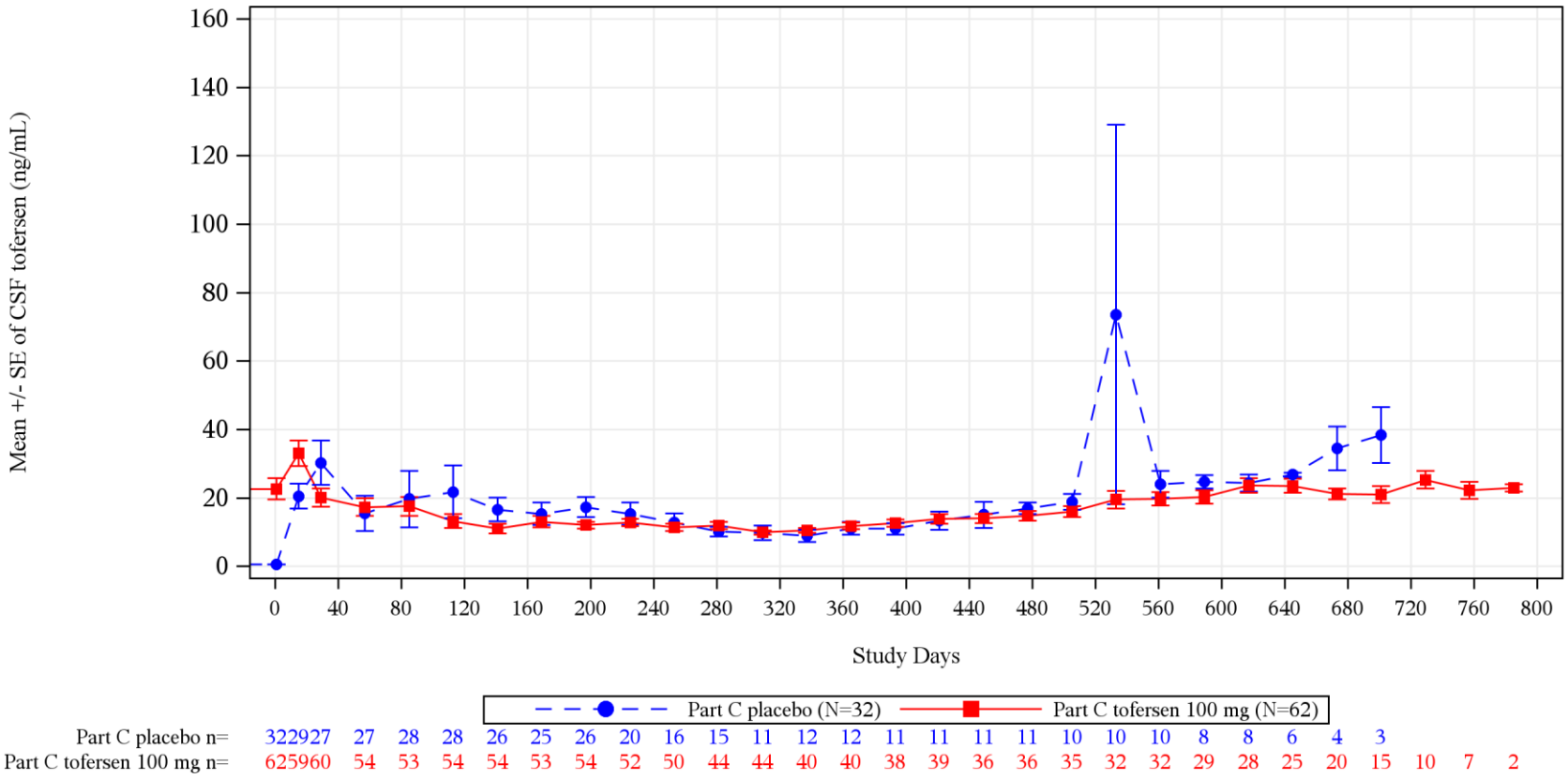
101 試験パート C でプラセボを投与した被験者のトラフ濃度は、トフェルセンを投与した被験者のトラフ濃度と同程度であった。

102 試験におけるパート A 及び B の被験者（16 週間超のウォッシュアウト期間後）及びパート C でプラセボを投与した 102 試験の被験者（トフェルセン未投与）の CSF 中 PK プロファイルは、先行した 101 試験パート A 及び B での経験に基づき予想された PK とおおむね同様であった。

同様の傾向は、2021 年 7 月 16 日の中間データカット時点のデータでも認められた（233AS102 試験の CSR、Interim 1、Figure 10 を参照）。

Figure 17 Study 233AS102: Line Plot of CSF Tofersen Concentration (ng/mL) Mean Values ± SE by Visit (Linear Scale, 16 January 2022 data cutoff) - PK Population

233AS102: Line plot of CSF tofersen concentration (ng/mL) mean values +/- SE by visit (linear scale) - PK population
Page: 1 of 1



NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: The mean values presented are arithmetic means.
NOTE 3: Extremely large concentration values (>1000) are not included.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid.
Source: biib067/233as102/iacut2-bla/f-pkpd-csf-conc-l-mean-byvis.sas:f-pkpd-csf-conc-l-mean-byvis-all.rtf Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 30MAR2022

2.1.4.2 血漿中トフェルセンの薬物動態

102 試験の被験者は用量を変更しており（負荷投与後に維持投与を実施）、そのことも観察結果の要約を困難にしている。血漿中トラフ濃度推移は被験者間変動が大きく、CV が 100%を超えることが多かった（Figure 18 及び 233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 11.4.1.1.1）。この被験者間変動のため、PK 結果の解釈は限定的である。

血漿中トラフ濃度推移は、負荷投与期間（Day 85 まで）後 2 ヵ月で安定したと考えられ、その後は時間と共にトラフ濃度上昇の方向に緩やかに変化するのが認められる。現時点では、この変化の理由は不明である。

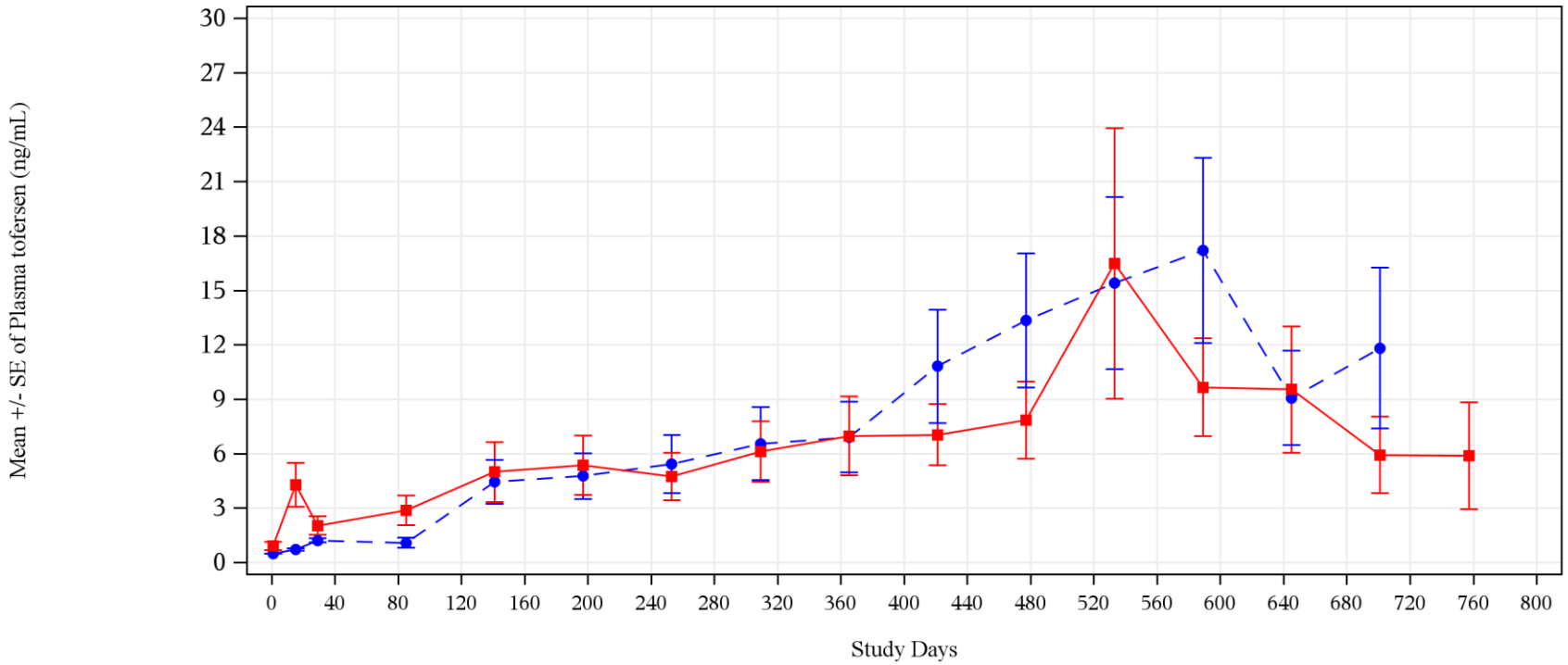
101 試験パート C でプラセボを投与した被験者のトラフ濃度は、トフェルセンを投与した被験者のトラフ濃度と同程度であった。

101 試験パート A 及び B から 102 試験に登録された被験者（16 週間超のウォッシュアウト期間後）及びパート C のプラセボから登録された被験者（トフェルセン未投与）の血漿中 PK プロファイルは、先行した 101 試験パート A 及び B での結果に基づき予想された PK とおおむね同様であった。

同様の傾向は、2021 年 7 月 16 日のデータカット時点のデータでも認められた（233AS102 試験の CSR、Interim 1、Figure 9 を参照）。

Figure 18 Study 233AS102: Line Plot of Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) Mean Values ± SE by Visit (Linear Scale, 16 January 2022 data cutoff) - PK Population

233AS102: Line plot of plasma tofersen concentration (ng/mL) mean values +/- SE by visit (linear scale) - PK population
Page: 1 of 1



NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: The mean values presented are arithmetic means.
Source: biib067/233as102/iacut2-bla/f-pkpd-pl-conc-ln-mean-byvis.sas:f-pkpd-pl-conc-ln-mean-byvis-all.rtf Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 30MAR2022

2.1.4.3 CSF 中総 SOD1 タンパク質

パート C の被験者

- ITT 集団では、先行した 101 試験パート C でトフェルセンを投与した 102 試験の被験者は、パート C でプラセボを投与した被験者に比べてベースライン時の CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度の幾何平均値が低かった。
  - 101 試験パート C でトフェルセンを投与し、102 試験でトフェルセンを継続した被験者は、102 試験の Week 24 まで CSF 中 SOD1 濃度が持続的に減少し、102 試験の Week 24 には 102 試験のベースライン値から 2%減少した（ベースラインに対する GMR）（ITT 集団）（Table 14）。
  - 101 試験パート C でプラセボを投与し、102 試験でトフェルセンを開始した被験者は、102 試験のベースラインから Week 24 までの間に CSF 中 SOD1 濃度が 14%減少した（ITT 集団）。
- 同様の傾向は疾患進行の部分集団（「エンリッチ」部分集団では Week 24 まで、「その他」の部分集団では Week 52 まで）でも認められた（233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 14.3.2.2.1、Output 4 及び 5）。

パート A 及び B の被験者

- 102 試験登録前に規定したウォッシュアウト期間の後、102 試験に登録されたパート A 及び B の被験者では、102 試験のベースラインから Week 104 までの間に CSF 中総 SOD1 タンパク質が 31%減少した（ベースラインに対する GMR）［233AS102 試験の CSR、Interim 2、Table 25］。中間データカット時点で Week 196 まで追跡を行った被験者は少なかったが、この時点でも減少は維持されていた。

解析の追加の詳細は、233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 11.4.2 に示す。

Table 14 Study 233AS102: Summary of Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline in Total CSF SOD1 Protein for Part C Participants - ITT Population

	Previous Placebo (N=32)	Previous Tofersen 100 mg (N=63)
Study 233AS102 Baseline Geometric Mean (Geometric Mean± SE) ng/mL	117.46 (107.66, 128.16)	72.65 (68.47, 77.09)
Adjusted GMR to Baseline (95% CI) at Week 12	0.82 (0.70, 0.97)	0.96 (0.85, 1.08)
Adjusted GMR to Baseline (95% CI) at Week 24	0.86 (0.70, 1.05)	0.98 (0.85, 1.13)

Note: MI was used for missing data. The model included corresponding prior treatment in 233AS101 Part C (tofersen or placebo), log baseline value for the endpoint, as well as all available postbaseline values. Transformed data were used.
Note: Adjusted geometric means, ratios to baseline, and corresponding SEs were obtained from the ANCOVA model for change from baseline including prior treatment in Study 233AS101 Part C as a fixed effect and adjusting for the following covariates: baseline disease duration since symptom onset and relevant baseline score. Note: Observed values are presented for baseline; no imputation were performed.
Source: CSR 233AS102 Interim 2, Table 24

2.1.4.4 ニューロフィラメント

血漿中 NfL 濃度

本項では、102 試験で副次評価項目として評価した血漿中 NfL の結果を示す。CSF 中 NfL、血漿中 pNfH、及び CSF 中 pNfH（いずれも探索的評価項目として評価）についても、同様の効果が認められた（233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 11.4.2.2）。

パート C の被験者

- 102 試験では、先行した 101 試験パート C でトフェルセンを投与した被験者は、101 試験パート C でプラセボを投与した被験者に比べてベースライン時の血漿中 NfL 濃度が低かった。
- 2022 年 1 月 16 日の中間データカット時点で、101 試験でトフェルセンを投与し、102 試験でトフェルセンを継続した被験者では、低下した血漿中 NfL 濃度が Week 24 まで維持され、102 試験のベースライン時から 2%増加した（ベースラインに対する GMR）（Table 15）。101 試験パート C でプラセボを投与し、102 試験でトフェルセンを開始した被験者は、102 試験のベースラインから Week 24 までの間に血漿中 NfL 濃度が 44%低下した（Table 15；Figure 19）。
- 同様の傾向は疾患進行の部分集団（「エンリッチ」部分集団では Week 24 まで、「その他」の部分集団では Week 52 まで）でも認められた［233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 14.3.2.2.2、Output 9 及び 10］。

パート A 及び B の被験者

- 101 試験パート A 及び B から登録された被験者の結果は、入手可能なデータが十分ではなかった（各来院時に 2 例以下）ため、本概要には含まれていない。

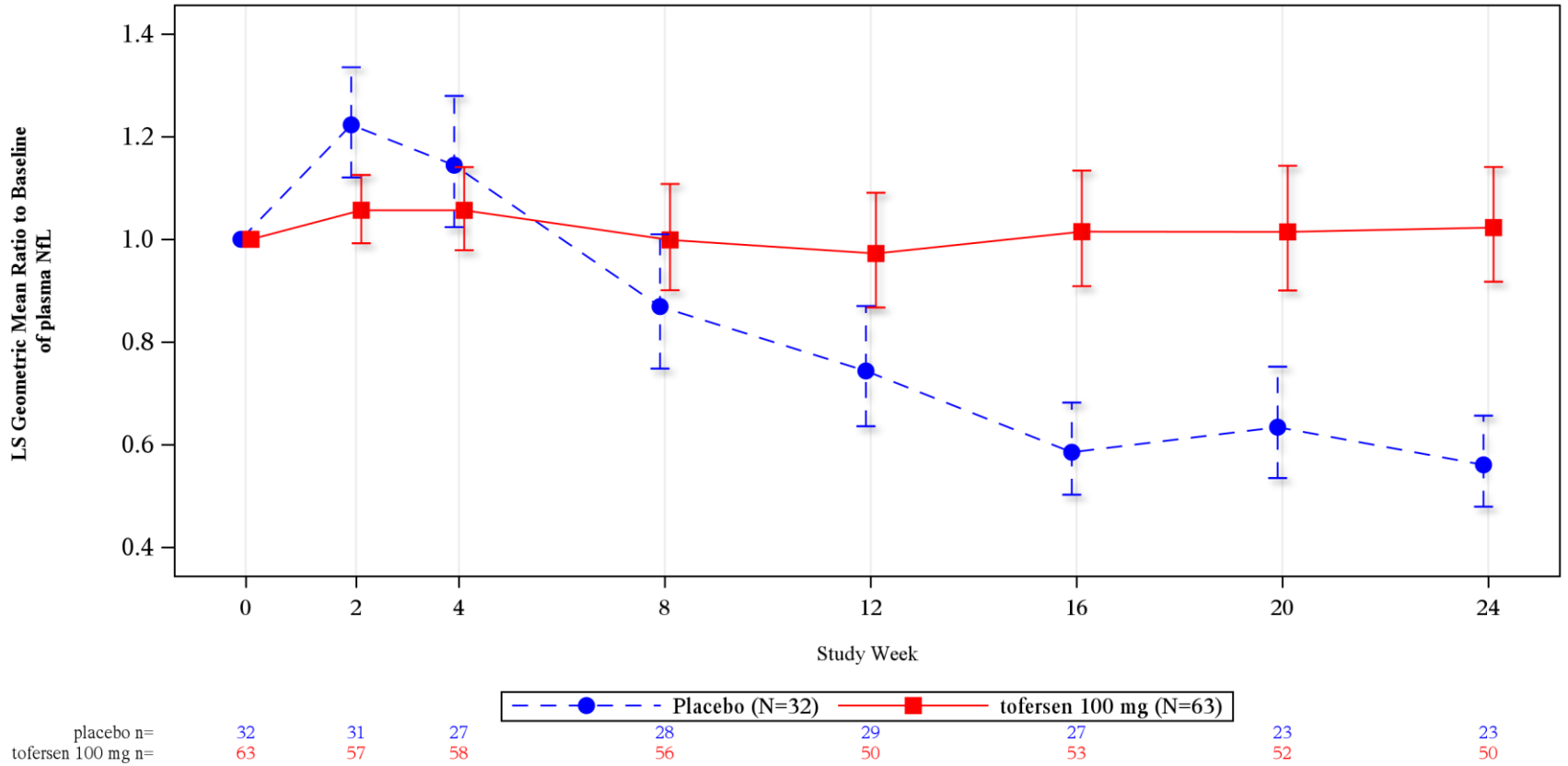
Table 15 Study 233AS102: Summary of Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline in Plasma NfL Analysis for Part C Participants -ITT Population

	Previous Placebo (N=32)	Previous Tofersen 100 mg (N=63)
Study 233AS102 Baseline geometric mean (Geometric Mean± SE) pg/mL	60.75 (50.40, 73.22)	28.81 (25.73, 32.26)
Adjusted GMR to Baseline (95% CI) at Week 12	0.74 (0.63, 0.87)	0.97 (0.87, 1.09)
Adjusted GMR to Baseline (95% CI) at Week 24	0.56 (0.48, 0.66)	1.02 (0.92, 1.14)

Note: MI was used for missing data. The model included corresponding prior treatment in Study 233AS101 Part C (tofersen or placebo), log baseline value for the endpoint, as well as all available postbaseline values. Transformed data were used.
Note: Adjusted geometric means, ratios to baseline, and corresponding SEs were obtained from the ANCOVA model for change from baseline including prior treatment in Study 233AS101 Part C as a fixed effect and adjusting for the following covariates: baseline disease duration since symptom onset and relevant baseline score.
Note: Observed values were presented for baseline; no imputation was performed.
Sources: CSR 233AS102 Interim 2 Table 26

Figure 19 Study 233AS102: Line Plot of Plasma NfL Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline Values (95% CI) by Timepoint From ANCOVA Using MI - ITT Population

233AS102: Line plot of plasma NfL LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by time point from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 1 of 2



Footnotes are displayed on last page.
Source: biib067/233as102/iacut2-bla/f-pkpd-pnfl-gm-anc-byvis-itt.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 06APR2022

233AS102: Line plot of plasma NfL LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by time point from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 2 of 2

NOTE 1: Baseline is defined as day 1 value prior to the study drug. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.
NOTE 2: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 4.9 pg/mL) in calculations.
NOTE 3: Multiple imputation is used for missing data.
NOTE 4: The analysis is based on ANCOVA model with natural log transformed data. The model includes covariates for the corresponding baseline value i.e. log value, baseline disease duration since symptom onset and prior study treatment use at 233AS101 Part C.
Abbreviations: NfL = neurofilament light chain; ANCOVA = analysis of covariance; MI = multiple imputation; LS = least square.
Source: biib067/233as102/iacut2-bla/f-pkpd-pnfl-gm-anc-byvis-itt.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 06APR2022

2.1.4.5 死亡したトフェルセン投与被験者の剖検試料による薬物動態解析

疾患に関連する合併症で死亡した 102 試験の 3 例で実施した剖検では、ALS の疾患進行に合致する所見が示された。いずれの被験者もトフェルセンへの曝露と関連なしと判断された。

脊髄及び脳の様々な領域にわたるトフェルセン濃度の定量的評価は、IT 投与した ASO 薬のヒト CNS 内での分布に関する理解を深め、予測モデルの構築を可能にするための極めて重要なステップである。これまで、ヒト CNS におけるトフェルセンの濃度は、非ヒト霊長類のデータに基づき構築された PBPK モデルを用いて予測されていた。剖検データが入手できる前は、トフェルセンの 101 試験のデザインを支持するためにスケーリングの方法が提案されていた。

目的

剖検の主な目的は以下のとおりであった。

- 様々な CNS 組織におけるトフェルセン濃度についてデータを示すこと
- 非ヒト霊長類及びその他の動物データを用いて構築した非臨床 PBPK モデルに基づく動物からヒトの CNS 曝露へのスケーリング法が適切であることを示すこと

方法 ― 剖検データの収集

死亡した 3 例（被験者 [redacted]、[redacted]、及び [redacted]）の家族から、剖検の同意を取得した。被験者 [redacted] は死亡時に試験を継続中であり、被験者 [redacted] 及び [redacted] は、それぞれ死亡する約 8 ヵ月前及び 18 ヵ月前に試験を中止していた。

認定病理医師が、被験者の実施医療機関において ALS Autopsy Tissue Collection Protocol（6 章、Appendix 4 を参照）に従って剖検を実施した。3 例それぞれの剖検報告書を 6 章の Appendix 5 に示す。CNS 領域（腰髄、胸髄、頸髄、髄質、大脳基底核、中脳、視床、小脳、橋、前頭皮質、側頭皮質、運動皮質、海馬、及びその他の脳深部領域）から採取した組織試料は液体窒素で凍結され、ドライアイス保存下で翌日配達により発送され、分析用試料を作成するまで-70°C で保存された。

ハイブリダイゼーション酵素免疫測定法を用いて組織試料を分析した。本法及びその分析能の詳細は、トフェルセンに関する「2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法」の 1.3.1.1.2 項に記載されている。

剖検を行った 3 例の人口統計学的情報、投与情報、及び死因の簡潔な要約を、6 章の Appendix 5、Section 3.2 に示す。これら 3 例はそれぞれ疾患に関連した病態により死亡しており、治験責任医師及び治験依頼者は、死亡に至った事象はトフェルセンと関連なしと判断した。

剖検を実施した被験者の投与量及び最終投与から死亡までの期間の記録を、6 章の Appendix 5、Table 1、Table 2、及び Table 3 に示す。

方法 – モデルに基づくヒト CNS 中濃度の予測

ヒト CNS 組織における曝露量の予測は、非ヒト霊長類に投与したトフェルセンの組織濃度データに基づいて最近構築され、調整された非臨床全身 PBPK モデルに基づいている。非ヒト霊長類モデルに関する説明は［Monine 2021］及び 6 章の Appendix 5 に示されている。

ヒト CNS 組織における曝露量を予測するために、2 つのスケーリングアプローチが採用された。

- 「容積に基づく（Volume-based）」アプローチでは、PBPK モデル構造は変更しないが、非ヒト霊長類に特有の生理学的容積を「代表的な」ヒトの容積に置き換えた。移行速度は変更していない。
- 「拡大モデル（Extended model）」アプローチでは、PBPK モデル構造を修正し、非ヒト霊長類モデルの 3 つの脊髄 CSF 腔（腰髄、胸髄、及び頸髄）をそれぞれ 3 つの同一コンパートメントに分けている。ほとんどの移行速度は変更していない。この修正は、脊髄 CSF 腔に存在する濃度勾配を考慮し、導入したものである。ヒトの脊柱は形状がはるかに長いため、この濃度勾配が顕著であり、増強されている可能性がある。脊髄の CSF は主要な投与部位であり、そこから脊髄以外の CNS 及び全身に薬剤が移行するため、特に重点を置いた。

ヒトへの両トランスレーションアプローチの詳細を、6 章の Appendix 5 に示す。モデルの構造及び使用したパラメータ値も示す。

次に、この 2 つの「ヒト化」PBPK モデルをそれぞれ用いて、本試験に参加した 3 例の投与及びサンプリング履歴のシミュレーションを行った。6 章の Appendix 5、Table 1、Table 2、及び Table 3 に示した 3 つの投与シナリオには、各被験者の最終投与から死亡までの期間（被験者 [redacted] が 18 ヵ月、被験者 [redacted] が 8 ヵ月、被験者 [redacted] が 47 日）を含めた。

非ヒト霊長類モデルからヒトへの両トランスレーションの方法、すなわち、生理学的容積を用いたスケーリング及び脊柱のコンパートメント構造の拡張は、剖検データが入手できる前に提案されていることに注意する必要がある。これらのモデルを剖検データに当てはめることはせず、シミュレーションのみを実施した。

結果

剖検を実施した被験者から入手できたすべての CNS 組織中のトフェルセン濃度の実測値を、6 章の Appendix 5、Table 4 に示す。Table 16 に、3 例の関連する CNS 領域で実測したトフェルセン濃度及び比較するモデル予測値を示す。関連する組織の複数部位から収集した濃度を示す生データは、PBPK モデル予測値と直接比較することが可能である。剖検を実施した各被験者で、大きな CNS 器官（皮質など）からは複数の試料が採取されたが、モデルではこれらの器官を均質なコンパートメントとして表し、局所的な濃度勾配は無視した。関連する組織の複数の部位から得た生データを、組織コンパートメント全体について行った PBPK モデル予測値と直接比較した。さらに、大脳皮質での比較をより適切にするために、皮質の複数のサンプリング部位（運動、前頭、上部など）で得られた局所濃度の実測値を平均した。

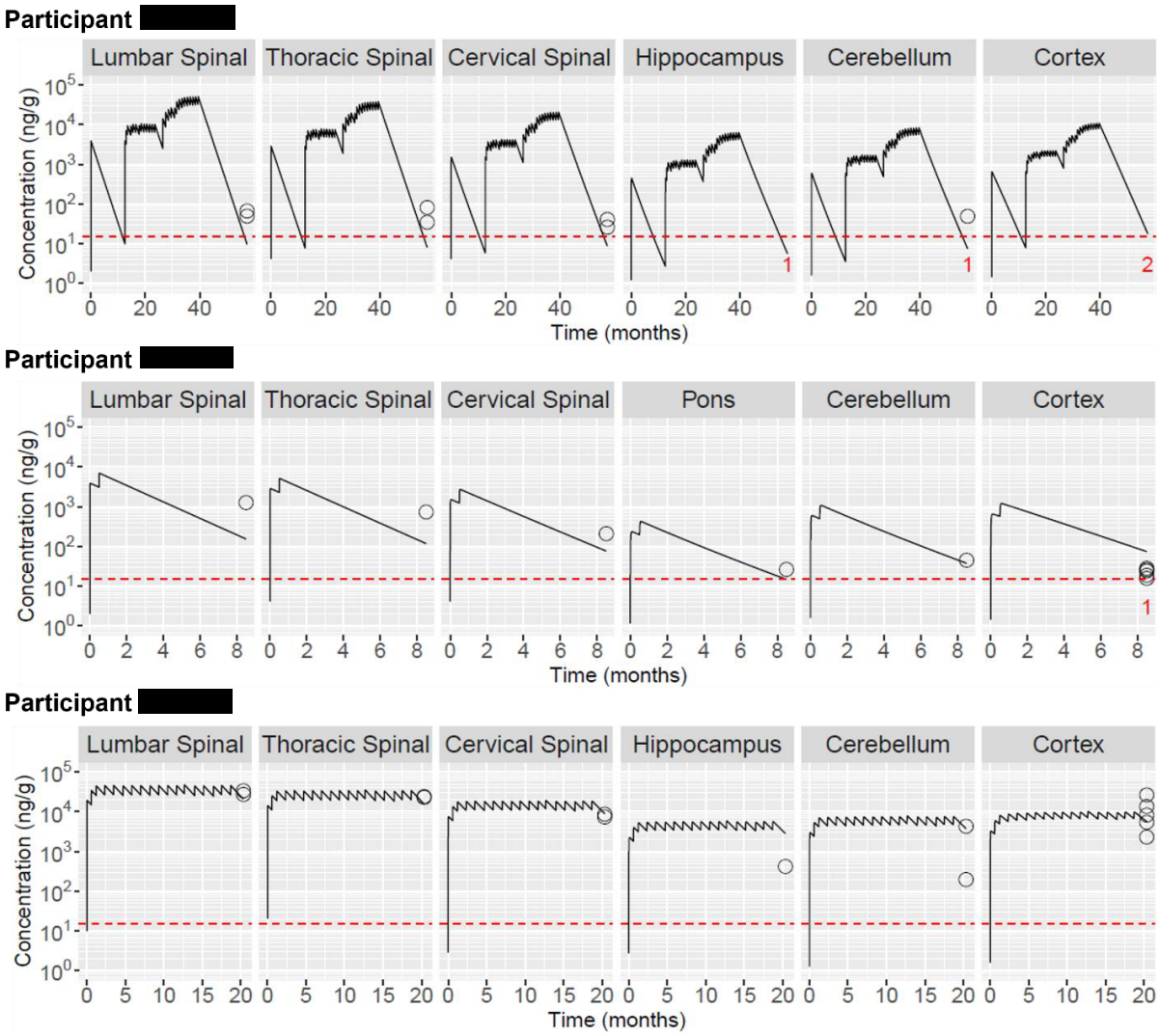
Table 16 Measured and Predicted Tofersen Concentrations for Participants [redacted], [redacted], and [redacted] After Autopsy

ID	Tissue	Measured Concentration (ng/g)[1]	Predicted Concentration (ng/g)	
			Physiol. volumes	Extended
[redacted]	Lumbar Spinal Cord	66.6 (Ventral Horn) 49.4 (Dorsolateral WM)	9.5	1763.4
	Thoracic Spinal Cord	34.6 (Ventral Horn) 81.5 (Dorsolateral WM)	8.0	1055.5
	Cervical Spinal Cord	26 (Ventral Horn) 40.7 (Dorsolateral WM)	8.7	450.2
	Cerebellum	49 (Cortex) <LLOQ (Deep Gray)	7.4	2.2
	Hippocampus	<LLOQ	5.6	1.7
	Cortex	<LLOQ (Motor) <LLOQ (Middle Frontal)	17.7	4.2
[redacted]	Lumbar Spinal Cord	1271	153.4	2552
	Thoracic Spinal Cord	734	117.4	1508
	Cervical Spinal Cord	209	76.1	629.4
	Cerebellum	44.8	37.5	23.7
	Pons	26.3	14.7	9.3
	Cortex	25.7 (Motor) <LLOQ (Dorsolateral Motor) 15.6 (Frontal) 28.0 (Dorsolateral Frontal) 18.7 (Temporal) 24.1 (Dorsolateral Temporal)	73.9	45.2
[redacted]	Lumbar Spinal Cord	27389 (Ventral Horn) 33768 (Dorsolateral WM)	23345.8	116766.7
	Thoracic Spinal Cord	23133 (Ventral Horn) 24100 (Dorsolateral WM)	17489.6	68884.0
	Cervical Spinal Cord	8683 (Ventral Horn) 7383 (Dorsolateral WM)	10009.8	28493.8
	Cerebellum	4307 (Cortex) 196 (Deep Gray)	4238.5	2466.7
	Hippocampus	418	3189.6	1856.3
	Cortex	13575 (Motor) 2308 (Sensory) 26581 (Occipital) 5434 (Middle Frontal) 8272 (Superior Temporal)	6393.1	3695.1

[1]LLOQ = 15.0 ng/g.
Source: Section 6, Appendix 5, Table 4 and Table 5

例として、被験者 [redacted]、[redacted]、及び [redacted] のそれぞれで死亡まで完全な投与シナリオが用いられた場合の PBPK モデルによるシミュレーションを Figure 20 に示す。これらのシミュレーションは、ヒトの生理学的容積によりスケーリングを行った PBPK モデルを用いて実施した。

Figure 20 PBPK Model Simulations with the Complete Dosing Scenarios Until Death for Each of the Participants [redacted], [redacted], and [redacted]



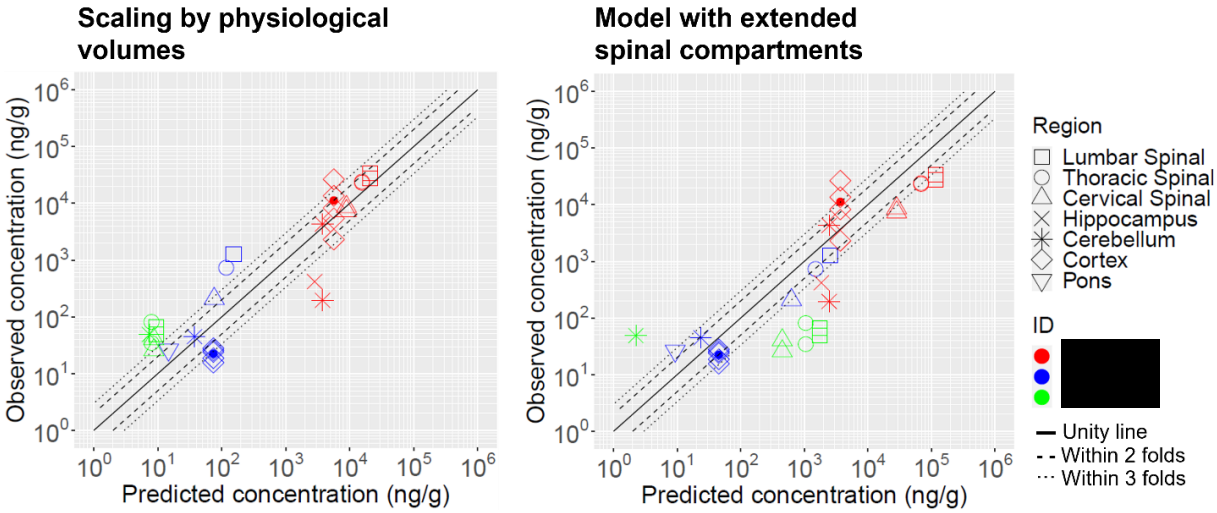
The model with physiological volume-based scaling was used (solid lines). Cortical and spinal cord tissues were sampled at multiple locations, as shown by open symbols. Red dashed line denotes the lower limit of quantitation (15 ng/g). The number of observations below the lower quantitation limit is shown in red. Source: Section 6, Appendix 5, Figure 1

Figure 21 は、剖検時の CNS 組織中濃度の実測値とシミュレーション値の一致度を示す。CNS のほとんどの部位で、両スケーリングモデルにより、実測データの 2～3 倍の範囲内で予測値が示されている。

Figure 22 は、剖検を実施した各被験者での投与前の様々な時期における腰髄 CSF 中濃度の実測値とシミュレーション値の一致度を示す。

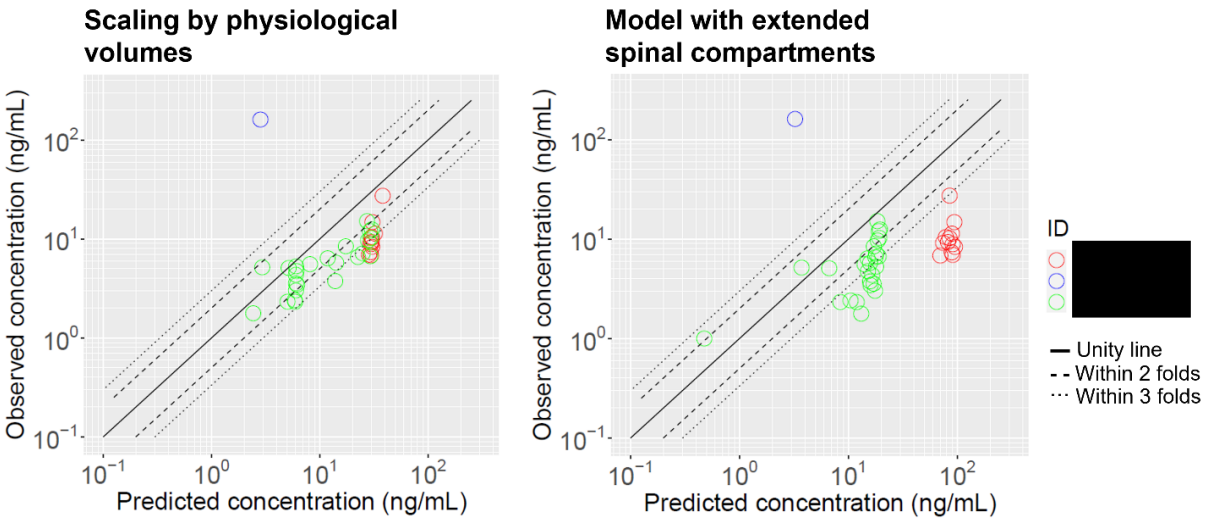
両スケーリングモデルでは、概して CSF 中濃度の実測値よりも高い値が予測されているが、生理学的容積に基づくスケーリングを用いたモデルでは、被験者 [redacted] 及び [redacted] の CSF 中トラフ濃度のほとんどの予測値は、実測データの 2～3 倍の範囲内となっている。被験者 [redacted] から入手できた 1 個の CSF 中トラフ濃度は異常に高く、解釈はできなかった。

Figure 21 Model Predictions Versus the Observed Tofersen Concentrations in the CNS Tissues for the Three Autopsy Study Participants



Open symbols denote direct measurements in multiple locations. Dots denote means of observations across multiple locations in cortex from Participants [redacted] and [redacted].
Source: Section 6, Appendix 5, Figure 2

Figure 22 Model Predictions Versus the Observed Tofersen Concentrations in CSF for the Three Autopsy Study Participants



Each open symbol corresponds to an individual observed pre-dose (trough) concentration of tofersen in CSF versus prediction made at the same timepoint across Studies 101 and 102.
Source: Section 6, Appendix 5, Figure 3

結論

このシミュレーションは、非ヒト霊長類のデータのみに基づき構築された現在のトランスレーショナルモデルが適切であることを保証している。死亡後の剖検時に測定された濃度は、*in vivo* での濃度を十分表していることもあればそうでないこともあるが、現時点ではこれが、画像検査に頼らずヒトの CNS 中での曝露量をサンプリングする唯一の方法である。したがって、この情報は極めて貴重である。

CNS 中曝露量の推定値は、トフェルセンの臨床開発プログラムで実施する投与レジメンに関する重要な決定に用いられてきた。このような推定値の信頼性は、決定の質に関して極めて重要である。

PBPK モデルによりシミュレーションした濃度と実測した濃度の一致度が高いことは、既存の全身 PBPK からトフェルセン濃度を一定（2～3 倍）の範囲内で適切に予測できることを示している。この予測範囲は、*in vitro*/*in vivo* での外挿やトランスレーショナル（橋渡し的）な外挿でおおむね受け入れられる。

以上より、本項に示したモデルは、ヒト CNS 中のトフェルセン曝露量について信頼できる予測値を算出するための貴重な手法である。したがって、本シミュレーションは、臨床試験におけるトフェルセンの用量の根拠の裏付けとなる。

非ヒト霊長類とヒトにおけるプロセスや現象の違いをより適切に反映するため、さらに多くの研究及びモデルの改良が必要である。特に、速度定数については様々なトランスレーショナル技術の適用及び検証が可能である。

2.1.4.6 免疫原性

138 例で抗トフェルセン抗体反応を検査した。

2022 年 1 月 16 日のデータカットでは、全体で 18 例（13.0%）が、102 試験でのトフェルセンの初回投与前に ADA 陽性であった。トフェルセンを投与した被験者のうち 71 例（51.4%）で治験薬投与後に ADA の発現が認められ、このうち 63 例は持続性の反応（初回の陽性判定時点後、112 日以上経過してから 2 回以上又は 112 日未満のうちに 1 回以上、陽性判定があることと定義）と判断された。他の 8 例は一過性の反応（陽性判定が 1 回のみであり、その後 112 日以上陰性であること、又は 112 日未満のうちに 2 回以上陽性判定があり、その後、初回の陽性判定から 112 日以上経過してから得た試料が陰性であることと定義）と判断された（233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 14.4.3、Output 6）。

101 試験パート C のトフェルセン 100 mg 群の被験者：

101 試験パート C のトフェルセン 100 mg 投与群から 102 試験に移行した被験者では、治験薬投与後に発現した抗トフェルセン抗体の発現率は 46.8%（62 例中 29 例）であり、このうち 3 例は一過性、26 例は持続性と判断された（233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 14.4.3、Output 6）。

101 試験パート C のプラセボ群の被験者：

101 試験パート C のプラセボ群から 102 試験に移行した被験者では、治験薬投与後に発現した抗トフェルセン抗体の発現率は 56.3%（32 例中 18 例）であり、このうち 2 例は一過性、16 例は持続性と判断された（233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 14.4.3、Output 6）。

101 試験パート A＋パート B の被験者：

101 試験パート A 及び／又は B から 102 試験に移行した被験者では、治験薬投与後に発現した抗トフェルセン抗体の発現率は 54.5%（44 例中 24 例）であり、このうち 3 例は一過性、21 例は持続性と判断された（233AS102 試験の CSR、Interim 2、Section 14.4.3、Output 6）。

2.1.5 233HV101 試験の結果

本試験は早期中止のため、被験者数が少なく（3 例）PK データは限定されている。

2.1.5.1 CSF 中トフェルセンの薬物動態の結果

CSF 中のトフェルセン濃度は、すべての被験者で Day 15 まで測定可能であり、101 試験パート A 及び B と同様であった。

2.1.5.2 血清中トフェルセンの薬物動態の結果

トフェルセンは、IT 投与後 CNS 組織に分布するが、投与部位（CSF）から全身循環に速やかに移行し、投与後数時間以内に血清中 C_{max} に達した。平均血清中濃度は通常、C_{max} に達すると急激に減少し、これは主に血清から全身組織に広範に分布したためであった。

被験者数が少なかったため、記述統計量は示さなかったが、トフェルセン単回投与後の健康被験者の血清中 PK パラメータを Table 17 に示す。PK パラメータは、ALS 患者を対象とした 101 試験パート A 及び B で認められたものと同様であった。

トフェルセンを投与したすべての被験者の血清中濃度は、投与後 Day 15 時点で BLQ であったため、血清中終末相 $t_{1/2}$ を推定することはできなかった。データは、AUC の時間を無限大まで外挿するには不十分であったため、血清クリアランスの推定値は算出しなかった。

放射能データと比較するために、血清中 PK データを総投与量（100 mg 又は 66.7 mg）で標準化し、%ID/mL に変換した。血清中トフェルセン濃度は、全血液中の放射能によって測定した濃度と同様（おおむね 2 倍以内）であった。

Table 17 233HV101: PK Parameters

233HV101: Listing of PK parameters - PK analysis set
Page: 1 of 1
Treatment Group: 100mg tofersen in 15mL

Subject Number	Time Point Reference	AUC(0-24) (ng*hour/mL)	CMAX (ng/mL)	Tmax (hours)
[redacted]*	DAY 1 DOSE	1962	127	24
[redacted]	DAY 1 DOSE	3016	146	2
[redacted]	DAY 1 DOSE	9548	707	4

* Subject [redacted] had a major deviation receiving 66.7 mg of tofersen instead of 100 mg.
Source: biib067/233hv101/csr/l-pkparam.sas Run Date: 03AUG2021

2.1.5.3 薬力学の結果

PD の評価は実施しなかった。

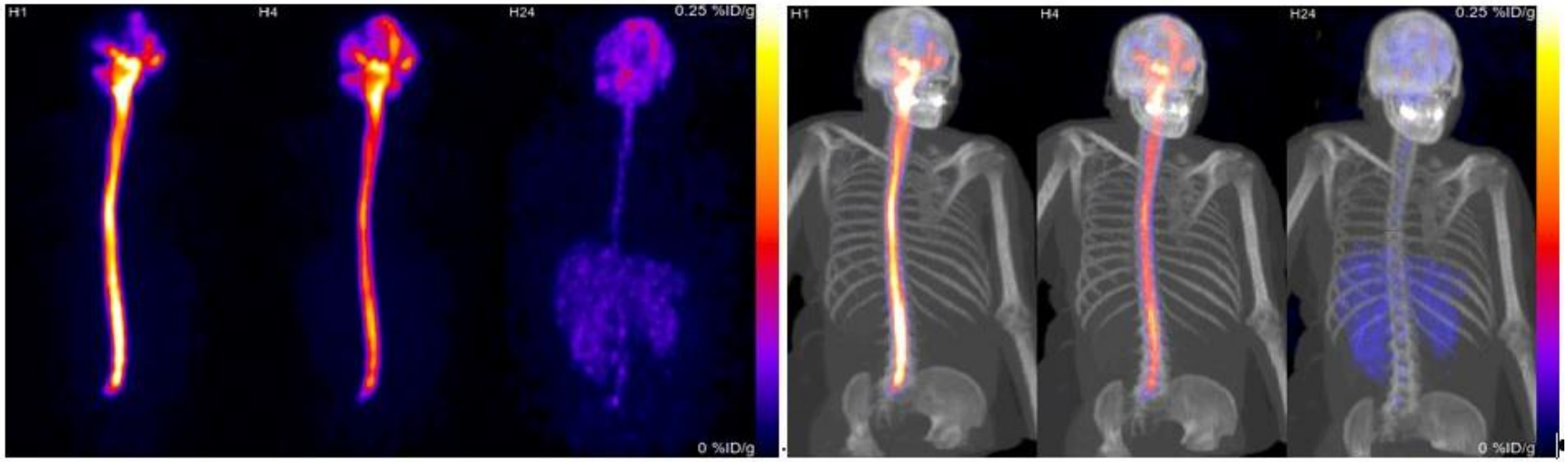
2.1.5.4 分布

^{99m}Tc-MAG3-BIIB067 単光子放射型コンピュータ断層撮影（SPECT）によるトフェルセンのヒト体内分布データは、被験者数が少なかった（3 例）ため、限られている。頭頂部から脊椎下部までの代表的な SPECT 画像を Figure 23 に示す。

投与後 24 時間の時点で、^{99m}Tc-MAG3-BIIB067 はすべての被験者で CNS 全体に広範に分布していた。評価したいずれの脳及び脊椎領域でも、^{99m}Tc-MAG3-BIIB067 は測定可能な放射能濃度を示した。

SPECT/コンピュータ断層撮影（CT）分析に基づくと、腰 IT 投与後、^{99m}Tc-MAG3-BIIB067 は 24 時間以内に吻側に脳まで分布した。腰椎の濃度は投与 1 時間後が最も高かった。各脊椎領域における濃度は、投与 24 時間後に最も低くなった。これに対応して、脳内の濃度は投与 1 時間後が最も低く、1 例では投与 4 時間後に、2 例では投与 24 時間後に最高となった。脳地図に基づく脳全体の平均濃度は、投与 24 時間後が最も高かった。観察された動態は、IT 投与した ASO の分布に関する理解と一致している。トフェルセンの分布の詳細は、233HV101 試験の CSR、Section 11.3.2.3.1 に示す。

Figure 23 Study 233HV101: Maximum Intensity Projection Images Over Time (1, 4, and 24 Hours Postdose) of Participant [redacted] with SPECT Only (Left) and SPECT Overlaid on CT (Right) and Scaled From 0 to 0.25 %ID/g



Source: CSR 233HV101, Figure 3

SPECT に基づくトフェルセン濃度の測定値を他のアッセイと比較して解釈する際には、SPECT 空間分解能が相対的に低いことを考慮することが重要である。

SPECT で測定したトフェルセンの相対濃度から、腰椎（投与部位）で最も高い濃度が測定され、脳で最も低い濃度が測定された。この所見は剖検結果と一致する（6 章、Appendix 5）。

3 全試験を通しての結果の比較と解析

233 SCE ISE SAP V[redacted]に記載されているように、より長期的なトフェルセンの作用を示すため、101 試験の無作為化比較対照試験期間で得たデータを長期継続試験（102 試験）から得たデータと統合した。

この統合解析は、101 試験の最終データ及び 2021 年 7 月 16 日のデータカット時点の 102 試験の中間データに基づき最初に実施された。このデータカット日は 101 試験パート C の完了と同時点であり、この時点で、パート C のすべての被験者が 6 ヵ月以上の追跡期間を有していた（233 SCE ISE SAP V[redacted]）。2 回目の統合解析は、2022 年 1 月 16 日のデータカット時点の 102 試験の中間データに基づき実施された。この時点で、パート C のすべての被験者が 12 ヵ月以上の追跡期間を有していた。盲検化及びデータの完全性の詳細は、「2.7.3 臨床的有効性」の 1.6.3 項に記載されている。

本項では、統合解析（データカット日：2022 年 1 月 16 日）の結果を要約する。2021 年 7 月 16 日のデータカット時点で得られた統合解析も利用可能である（ISS, Appendix 2.2 Concomitant Medications and Pharmacokinetics、Output 11、Output 13～15、ISE, Appendix 2.3.1 SOD1、Output 1～14、ISE, Appendix 2.3.2 NfL and NfH、Output 1～21）。

統合の主な焦点は、101 試験パート C の被験者の 101 試験及び 102 試験を通しての長期的な結果であった（プール CL 群）。被験者を以下のグループに分けた。

- 早期開始被験者：101 試験パート C でトフェルセン 100 mg 投与を開始し、102 試験でトフェルセン 100 mg 投与を継続した被験者
- プラセボ／投与開始遅延被験者：101 試験でプラセボを投与され、102 試験でトフェルセン 100 mg 投与を開始した被験者

より長期的なトフェルセンの作用を検討するため、第 I/II 相パート A 及び B の被験者の 101 試験及び 102 試験から得られたデータも統合した（プール ABL 群）。ただし、これらのデータを解釈する際は、以下の限界を考慮に入れるべきである。

- 被験者には、101 試験での治験薬の最終投与から 102 試験での初回投与までの間に、16 週間～2 年超にわたる長期のウォッシュアウト期間があった。
- 101 試験において追加の用量が安全であるとみなされたため、102 試験の用量が時間と共に増加し、被験者によって投与パラダイムが大きく異なっていた。
- 多くの被験者で、ウォッシュアウト期間及び低用量コホートへの曝露期間中に意味のある疾患進行が認められ、その結果、全試験の中でも試験中止となった被験者の割合が大きかった。

3.1 統合薬物動態解析

101 試験及び 102 試験の ALS 患者から得られた統合解析では、トフェルセン早期開始群とプラセボ／トフェルセン投与開始遅延群の CSF 及び血漿中 PK を比較した。統合 PK データから、CSF 及び血漿中のトフェルセンの PK は、101 試験パート B 及び C 並びに 102 試験のいずれにおいても同様であることが示されている。CSF 及び血漿中共に負荷投与期間直後に定常状態に達し

ている。月 1 回投与による CSF 中の薬物蓄積は、半減期が約 4 週間であることを示している。血漿中 T_{max} は通常、投与後 4～6 時間である。CSF 及び血漿中の曝露量にはいずれも顕著な被験者間変動が認められる（Figure 24 及び Figure 25）。

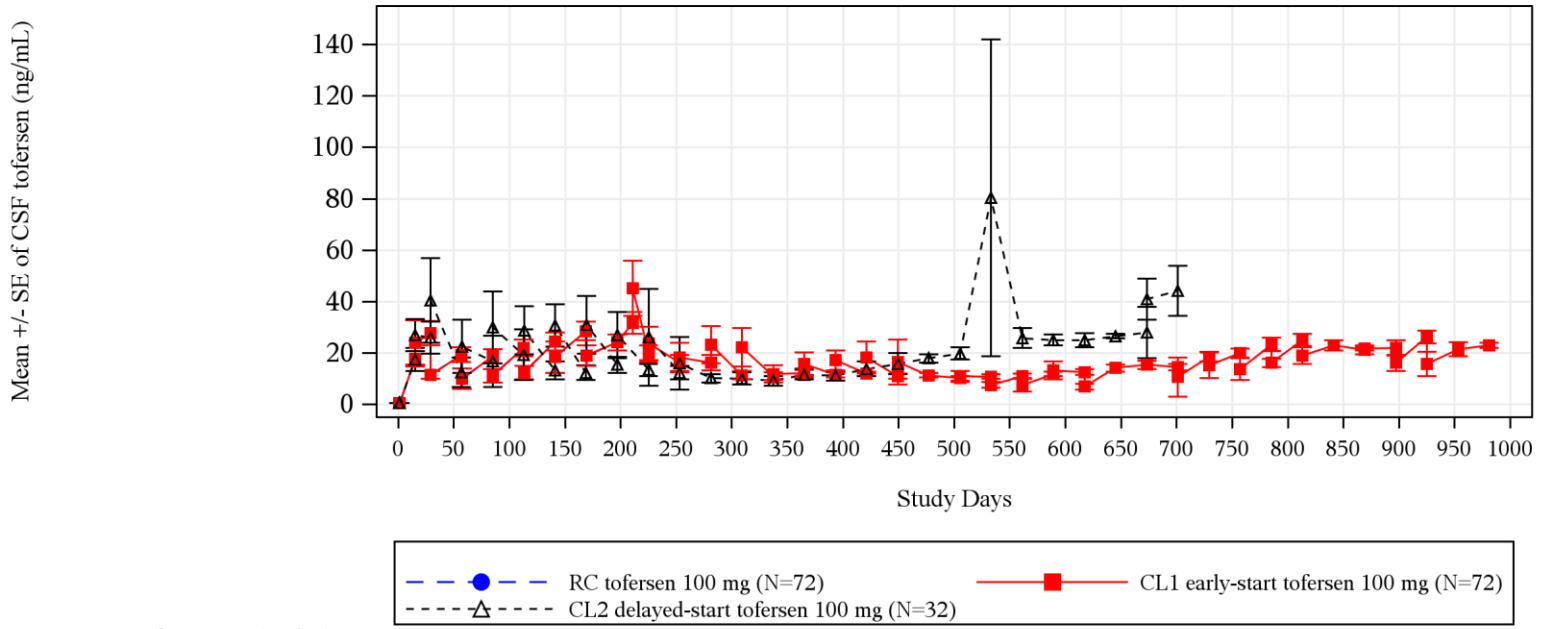
101 試験パート C 及び 102 試験の統合解析では、トフェルセンの早期開始群及び投与開始遅延群の CSF 中及び血漿中 PK を比較した（CSF 中濃度：Figure 26［早期開始群］及び Figure 27［投与開始遅延群］、血漿中濃度：Figure 28［早期開始群］及び Figure 29［投与開始遅延群］）。統合解析での PK データから、CSF 中及び血漿中トフェルセンの PK は 101 試験パート B 及びパート C 及び 102 試験と一貫していることが示された。

日本人被験者の CSF 中及び血漿中トフェルセン濃度推移は、外国人被験者の濃度推移の範囲と重複していた（Figure 26、Figure 27、Figure 28、及び Figure 29）。

統合 PK 解析（データカット日：2022 年 1 月 16 日）に関する Output は、ISS3 の Appendix 2.2 Concomitant Medications and Pharmacokinetics、Output 11、13～15 に示されている。

Figure 24　233AS101 and 233AS102 ISS: Line Plot of CSF Tofersen Concentration (ng/mL) Mean Values ± SE by Visit (Linear Scale) - PK Population

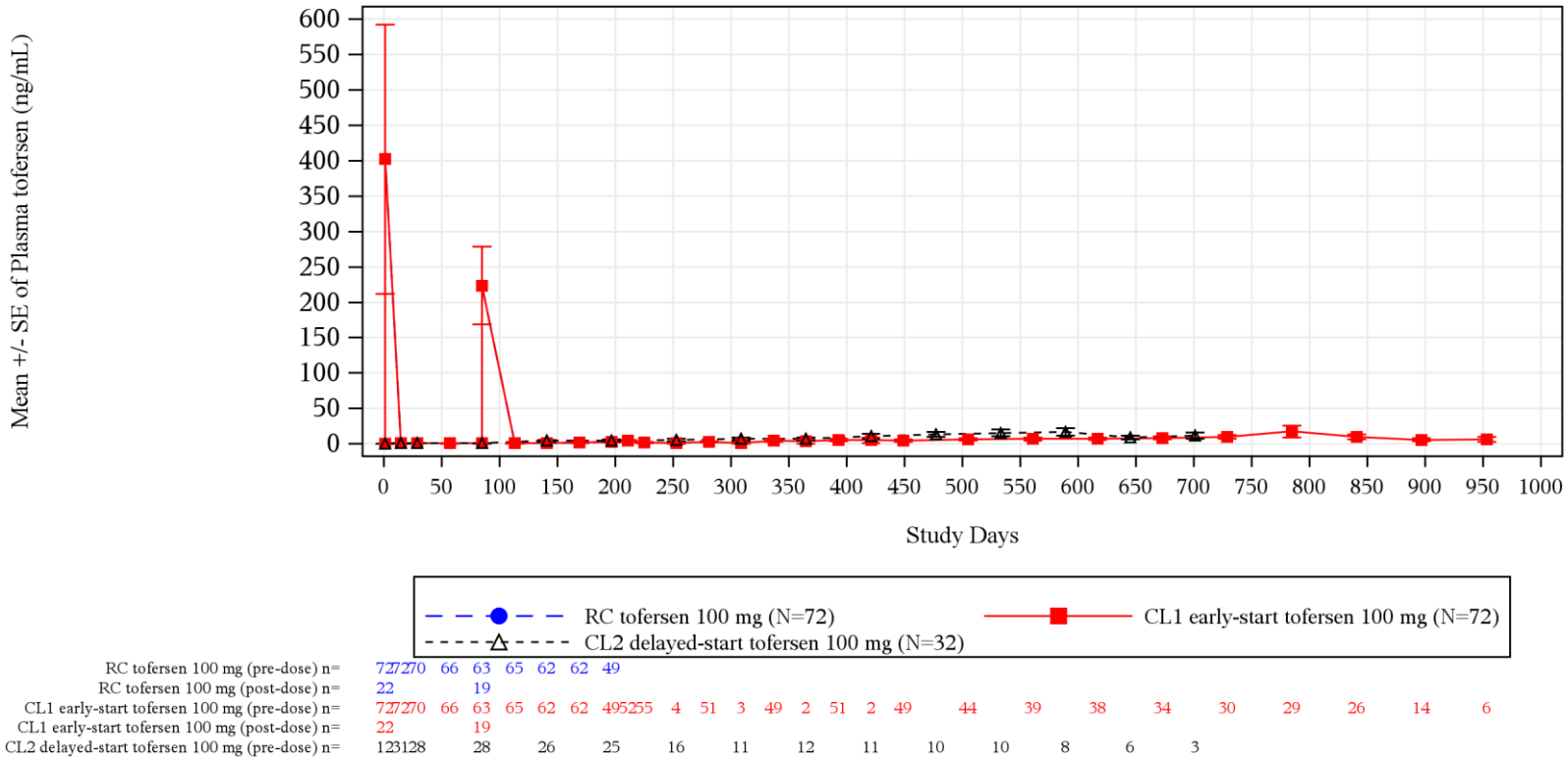
233AS101 and 233AS102 ISS: Line plot of CSF tofersen concentration (ng/mL) mean values +/- SE by visit (linear scale) - PK population
Page: 1 of 1



NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: The mean values presented are arithmetic means.
NOTE 3: If subjects had a gap>169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data from 233AS102 only is presented. If subjects had a gap<=169 days, then the data are excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they have no follow-up.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid.
Source: biib067/iss/iss-bla2/f-pkpd-csf-conc-l-mean-byvis.sas Run Date: 29MAR2022

Figure 25 Line Plot of Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) Mean Values ± SE by Visit (Linear Scale) - Safety Population

233AS101 and 233AS102 ISS: Line plot of plasma tofersen concentration (ng/mL) mean values +/- SE by visit (linear scale) - PK population
Page: 1 of 1

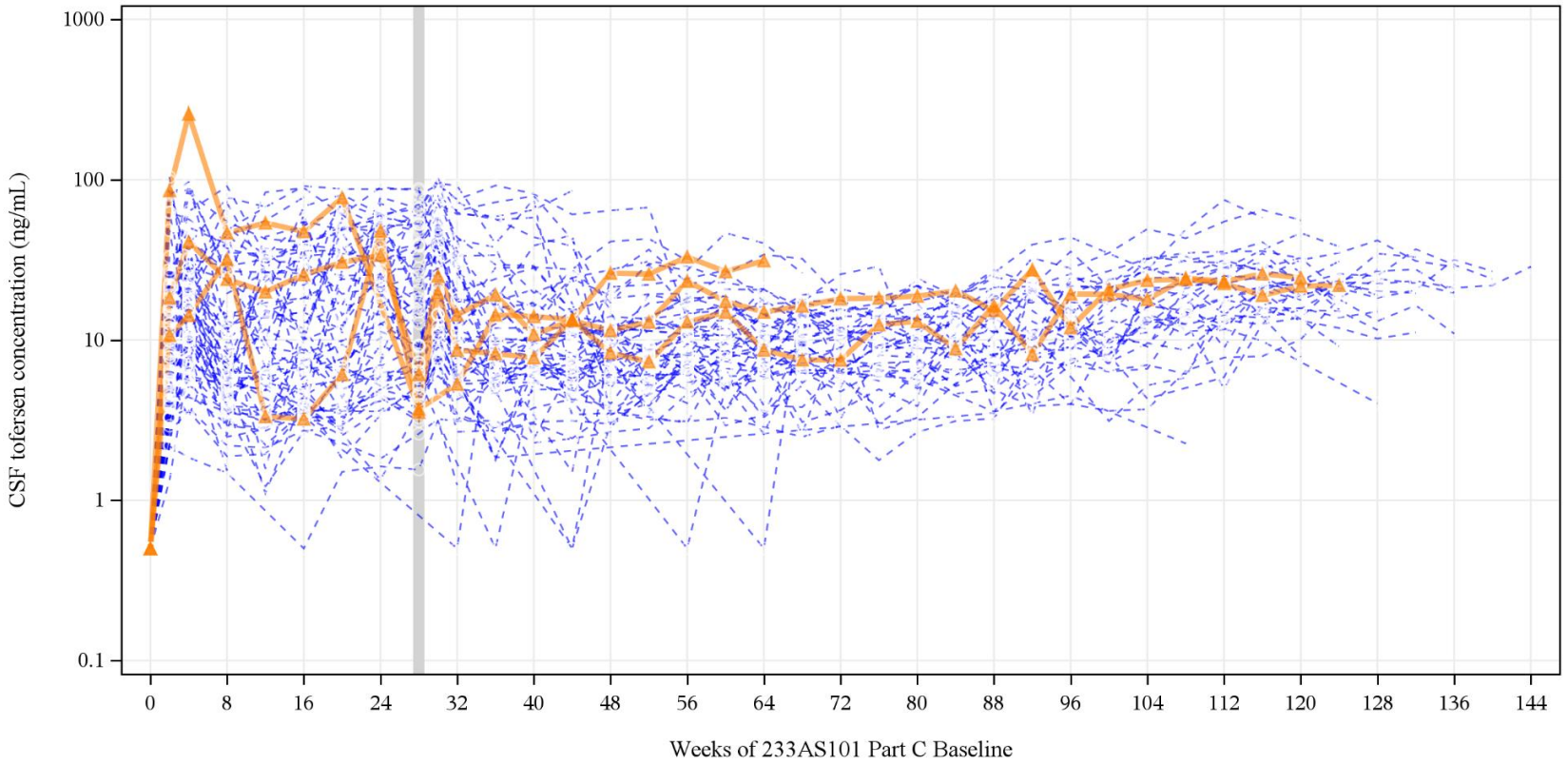


NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: The mean values presented are arithmetic means.
NOTE 3: If subjects had a gap>169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data from 233AS102 only is presented. If subjects had a gap<=169 days, then the data are excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they have no follow-up.
Source: biib067/iss/iss-bla2/f-pkpd-pl-conc-ln-mean-byvis.sas Run Date: 29MAR2022

Figure 26 233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti Plot of CSF Tofersen Concentration (ng/mL) by Visit (Semilogarithmic Scale): Early-Start Tofersen - PK Population

Page: 1 of 2

Early-start tofersen 100 mg (N=72 including 3 Japanese participants)



Footnotes are displayed on last page.

Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-csf-conc-es-ss-ol.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 20JUN2022

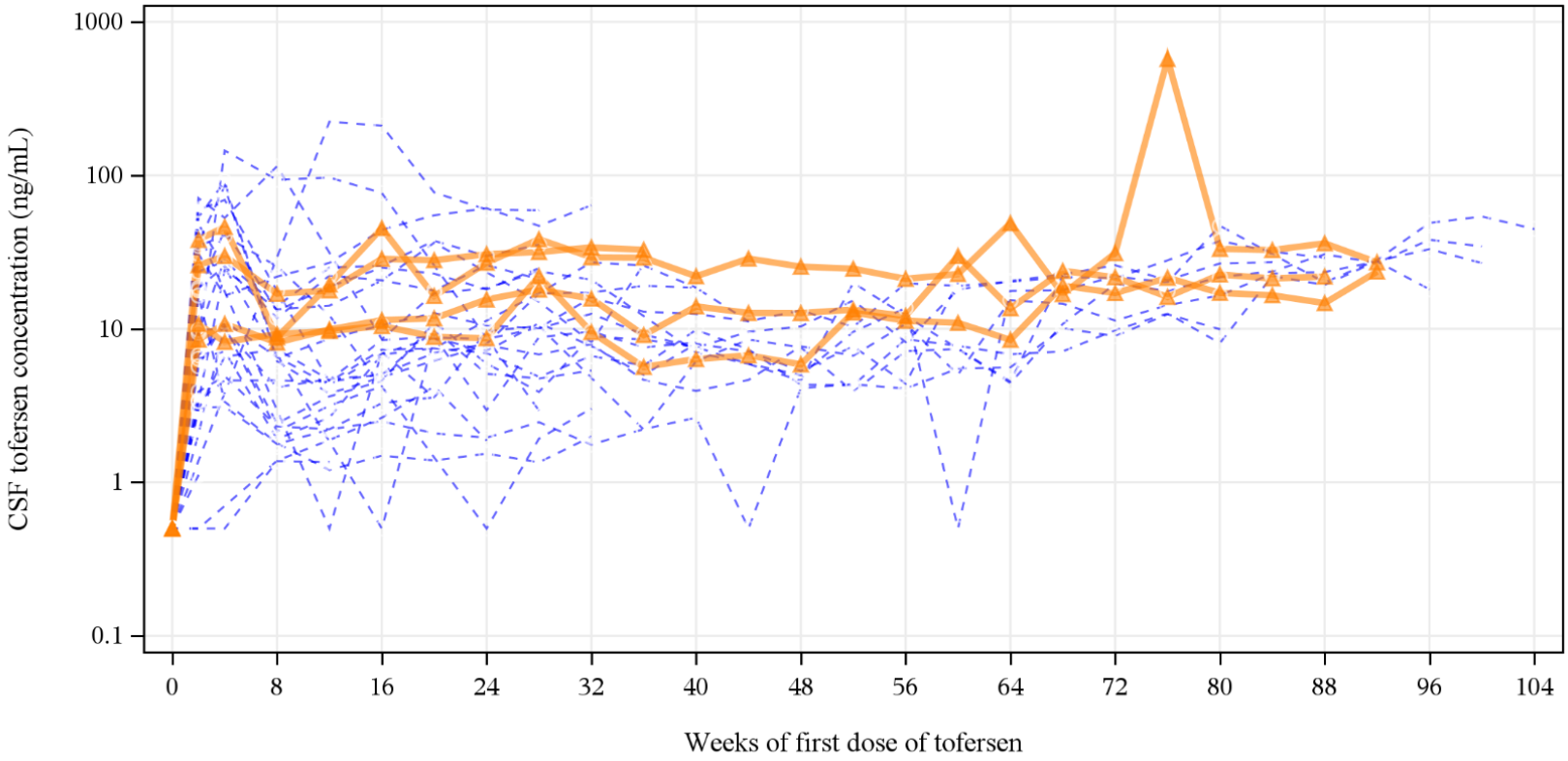
233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti plot of CSF tofersen concentration (ng/mL) by visit (semilogarithmic scale): early-start tofersen - PK population

NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: If subjects had a gap>169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data from 233AS102 only is presented. If subjects had a gap<=169 days, then the data are excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they have no follow-up.
NOTE 3: Values above 1000 ng/mL were excluded in analysis.
NOTE 4: Japanese subjects are colored orange and non-Japanese subjects are colored blue.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid.
Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-csf-conc-es-ss-ol.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 20JUN2022

Figure 27 233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti Plot of CSF Tofersen Concentration (ng/mL) by Visit (Semilogarithmic Scale): Delayed-Start Tofersen - PK Population

Page: 1 of 1

Delayed-start tofersen 100 mg (N=32 including 4 Japanese participants)

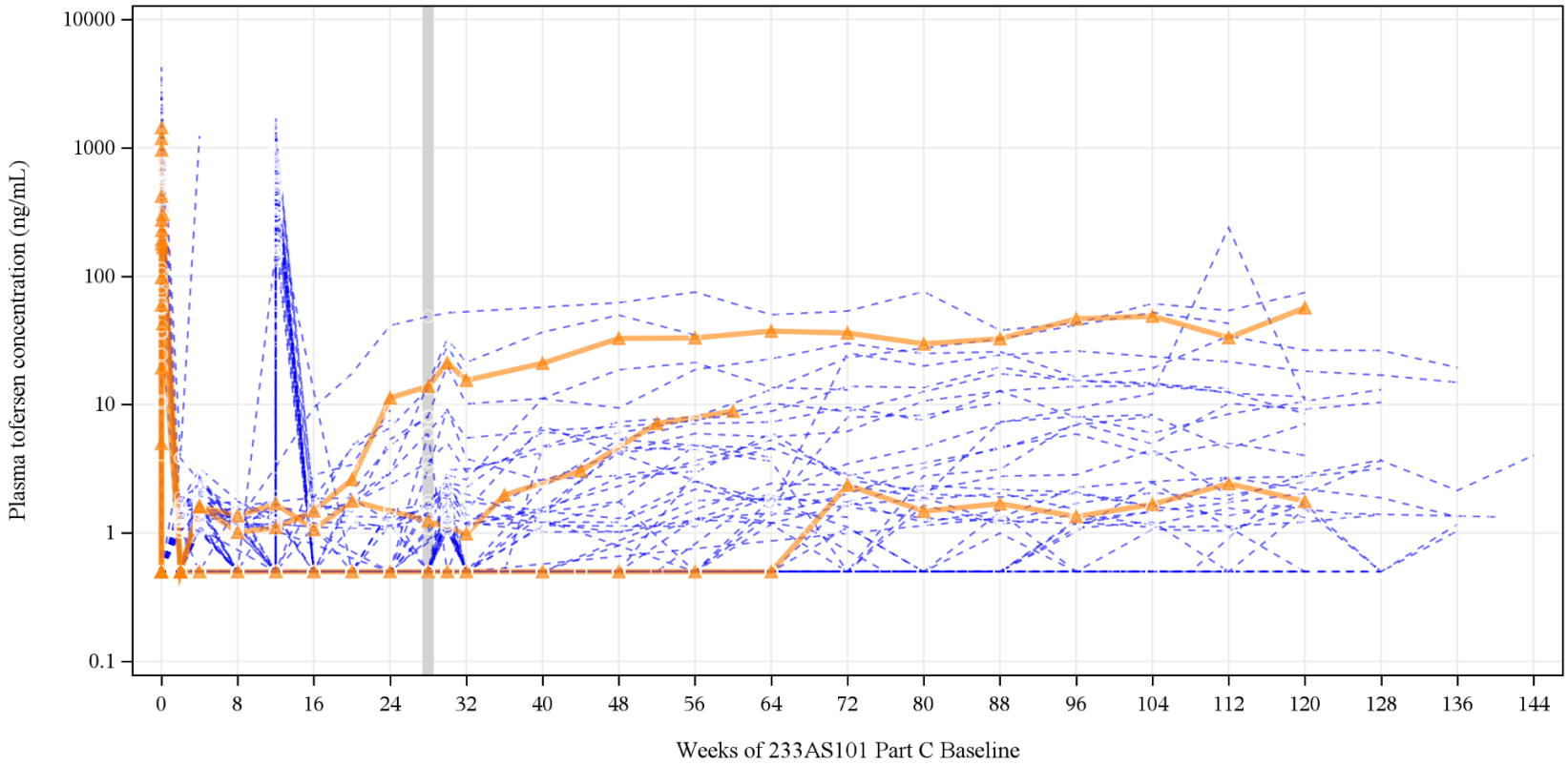


NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: If subjects had a gap>169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data from 233AS102 only is presented. If subjects had a gap<=169 days, then the data are excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they have no follow-up.
NOTE 3: Japanese subjects are colored orange and non-Japanese subjects are colored blue.
NOTE 4: Values above 1000 ng/mL were excluded in analysis.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid.
Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-csf-conc-ds-ss-ol.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 22JUN2022

Figure 28 233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti Plot of Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) by Visit (Semilogarithmic Scale): Early-Start Tofersen - PK Population

Page: 1 of 2

Early-start tofersen 100 mg (N=72 including 3 Japanese participants)



Footnotes are displayed on last page.

Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-pl-conc-es-ss-ol.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 20JUN2022

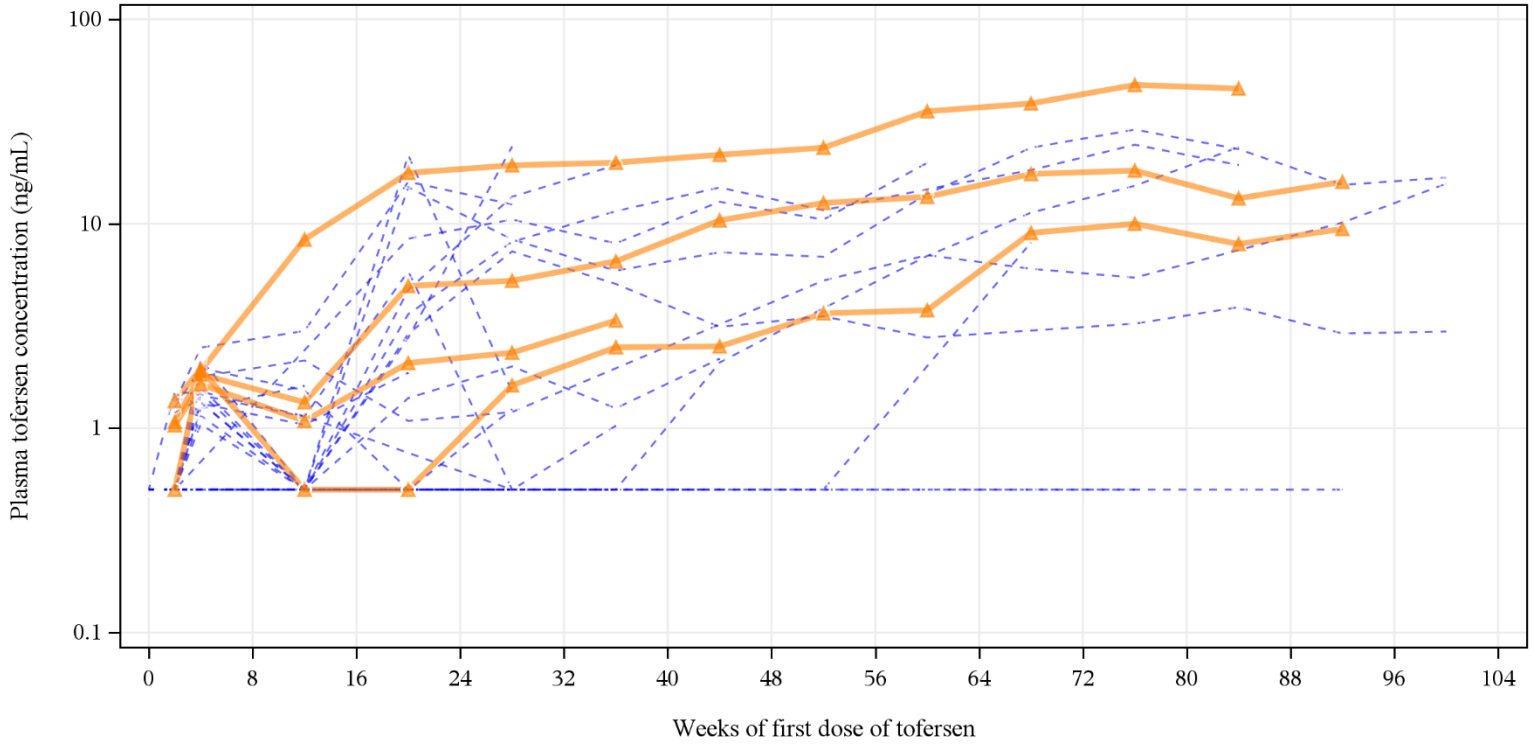
233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti plot of plasma tofersen concentration (ng/mL) by visit (semilogarithmic scale): early-start tofersen - PK population

NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: If subjects had a gap>169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data from 233AS102 only is presented. If subjects had a gap<=169 days, then the data are excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they have no follow-up.
NOTE 3: Japanese subjects are colored orange and non-Japanese subjects are colored blue.
Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-pl-conc-es-ss-ol.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 20JUN2022

Figure 29 233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti Plot of Plasma Tofersen Concentration (ng/mL) by Visit (Semilogarithmic Scale): Delayed−Start Tofersen - PK Population

Page: 1 of 1

Delayed-start tofersen 100 mg (N=32 including 4 Japanese participants)



NOTE 1: Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of lower limit of quantitation (LLOQ, 1 ng/mL) in calculations.
NOTE 2: If subjects had a gap>169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data from 233AS102 only is presented. If subjects had a gap<=169 days, then the data are excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they have no follow-up.
NOTE 3: Japanese subjects are colored orange and non-Japanese subjects are colored blue.
Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-pl-conc-ds-ss-ol.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 22JUN2022

3.2 トフェルセンの母集団薬物動態

SOD1 変異を有する ALS 患者の CSF 及び血漿中トフェルセンの母集団 PK 解析を実施した。この解析は、3.5.3 項及び 3.5.4 項の曝露－反応解析の一部としてより詳細に記載されており、6 章の Appendix 2 にさらに詳細に示されている。

3.3 トフェルセンの薬物動態特性

トフェルセンの PK は以下の試料及び解析で特徴づけられている。

- 101 試験パート A 及び B（SAD 及び MAD）の ALS 患者での血漿 PK 用試料の頻回サンプリング
- 101 試験パート C 及び 102 試験の SOD1 変異を有する ALS 患者での血漿 PK 用試料のスパースサンプリング
- 233HV101 試験の健康被験者での体内分布試験
- 全試験を通しての CSF のスパース（トラフのみ）サンプリング
- 母集団 PK 解析

全体として、トフェルセンの PK 特性は ALS 患者と健康被験者における全試験を通して同様であった。

CSF

- トフェルセンは、CSF への IT 注射によって CNS 内の作用部位の近傍への投与が可能である。
- トフェルセンの CSF 中トラフ濃度は用量に伴い増加したが、その増加は 20～100 mg で用量比例性を下回った。
- トフェルセン 10 mg を投与した被験者の CSF 中トフェルセン濃度は、すべての測定時点で BLQ であった。CSF 中濃度は 100 mg 群で最高、20 mg 群で最低となり、40 及び 60 mg 群では同程度であった。
- 全試験を通して、負荷投与期間の直後に定常状態の濃度に達した。負荷投与期間後の蓄積はわずかであり、非ヒト霊長類を用いたトフェルセンの非臨床 PK 試験と同様であった。

これに基づくと、CSF 中トフェルセンの有効半減期は約 1 ヵ月であった。CSF 中濃度の被験者間変動はおおむね中程度～高度（CV が 50%超）であった。

血漿／血清

- トフェルセンは CSF から全身循環に速やかに移行し、T_{max} は数時間以内であった。
- 血漿中 T_{max} は IT ボーラス投与後 2～6 時間であった。
- AUC 及び C_{max} は用量依存的であったが、用量比例性は評価できなかった。
- トフェルセンの曝露量は 20～60 mg の間ではほぼ線形に増加したが、100 mg 群では用量に伴って増加した。
- 非ヒト霊長類を用いたトフェルセンの非臨床 PK 試験と同様に、負荷投与期間後の血漿中への蓄積は少ない又はないことが示された。

- PK パラメータ値は、初回投与と最終投与でおおむね同様であった。

投与した被験者の血漿中濃度は Day 8（投与 168 時間後）以降は BLQ であったため、血漿中終末相 $t_{1/2}$ を推定することはできなかった。観察された血漿中濃度の減少は再分布相を示すと考えられる。トフェルセンの血漿中 C_{max} 及び AUC 値の被験者間変動は、おおむね中程度～高度であった（60%の範囲又は 60%超）。

CNS 組織

102 試験の剖検試料から得た PK データは、非ヒト霊長類に基づくトランスレーショナル PBPK モデルによってヒトでのトフェルセン曝露を予測できることを裏付けていた（2.1.4.5 項）。

- 脳の複数領域で測定可能な濃度のトフェルセンが認められ、標的とする CNS 組織内での広範な分布が示された。
- 非ヒト霊長類に基づくトランスレーショナル PBPK モデルから予測される CNS 組織中の濃度は、実測濃度の 2～3 倍以内であった。

3.4 トフェルセンの薬力学

3.4.1 CSF 中総 SOD1 タンパク質

プール CL 群では、トフェルセン早期開始群で CSF 中総 SOD1 の減少が 52 週間の追跡期間中持続した（Figure 30 及び Table 18）。同様の減少は、トフェルセン開始時期が遅かったプラセボ／トフェルセン投与開始遅延群（Figure 30 及び Table 18）及び疾患進行の部分集団（ISE, Appendix 3.3.1 SOD1 and Deamidated SOD1、Output 12 及び Output 14）でも認められた。

ITT 集団において、日本人集団における CSF 中総 SOD1 タンパク質濃度（オレンジ色の線）の経時的な変化は、おおむね全体集団の変動範囲内であった（Figure 31；上図：早期開始群、下図：プラセボ／投与開始遅延群）。

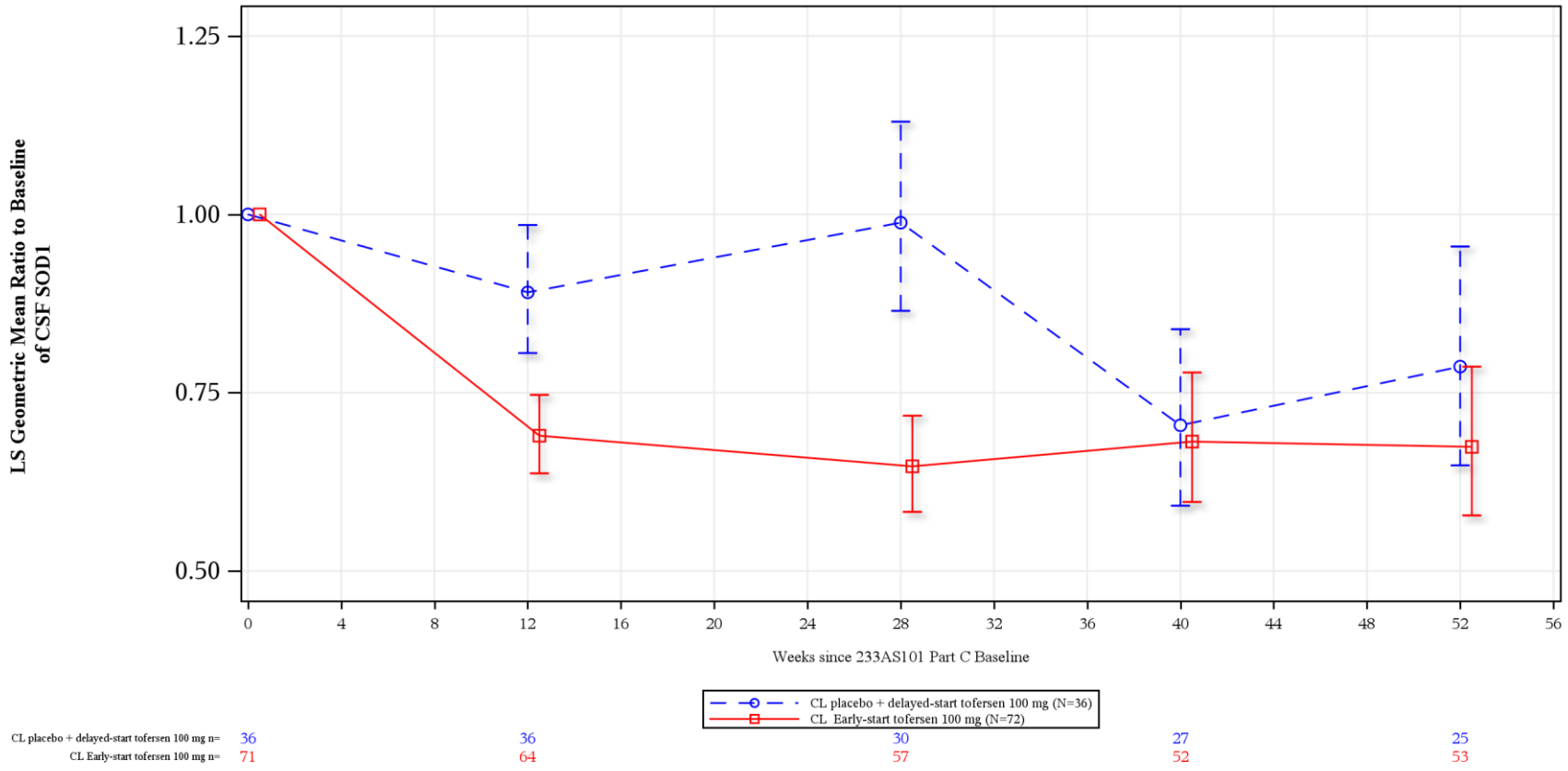
同様に、プール ABL 群で認められた CSF 中総 SOD1 の減少も、104 週間を超える追跡期間中持続した（Table 19）。

2022 年 1 月 16 日のデータカットでのプール CL 群及びプール ABL 群の CSF 中総 SOD1 タンパク質に関する統合データは、ISE, Appendix 3.3.1 SOD1 and Deamidated SOD1、Output 1～16 に示す。

2021 年 7 月 16 日のデータカットでのプール CL 群及びプール ABL 群の CSF 中総 SOD1 タンパク質に関する統合データは、ISE, Appendix 2.3.1 SOD1、Output 1～14 に示す。

Figure 30 233AS101 and 233AS102: Line Plot of Total CSF SOD1 Adjusted Geometric Mean Ratio to Study 101 Part C Baseline (95% CI) by Visit to Week 52 from ANCOVA Using MI - ITT Population

233AS101 and 233AS102 ISE: Line plot of total CSF SOD1 protein LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by time point from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 1 of 2



Footnotes are displayed on last page.
Source: biib067/ise/ise-bla2/f-pkpd-sod-anc-clitt.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 07APR2022

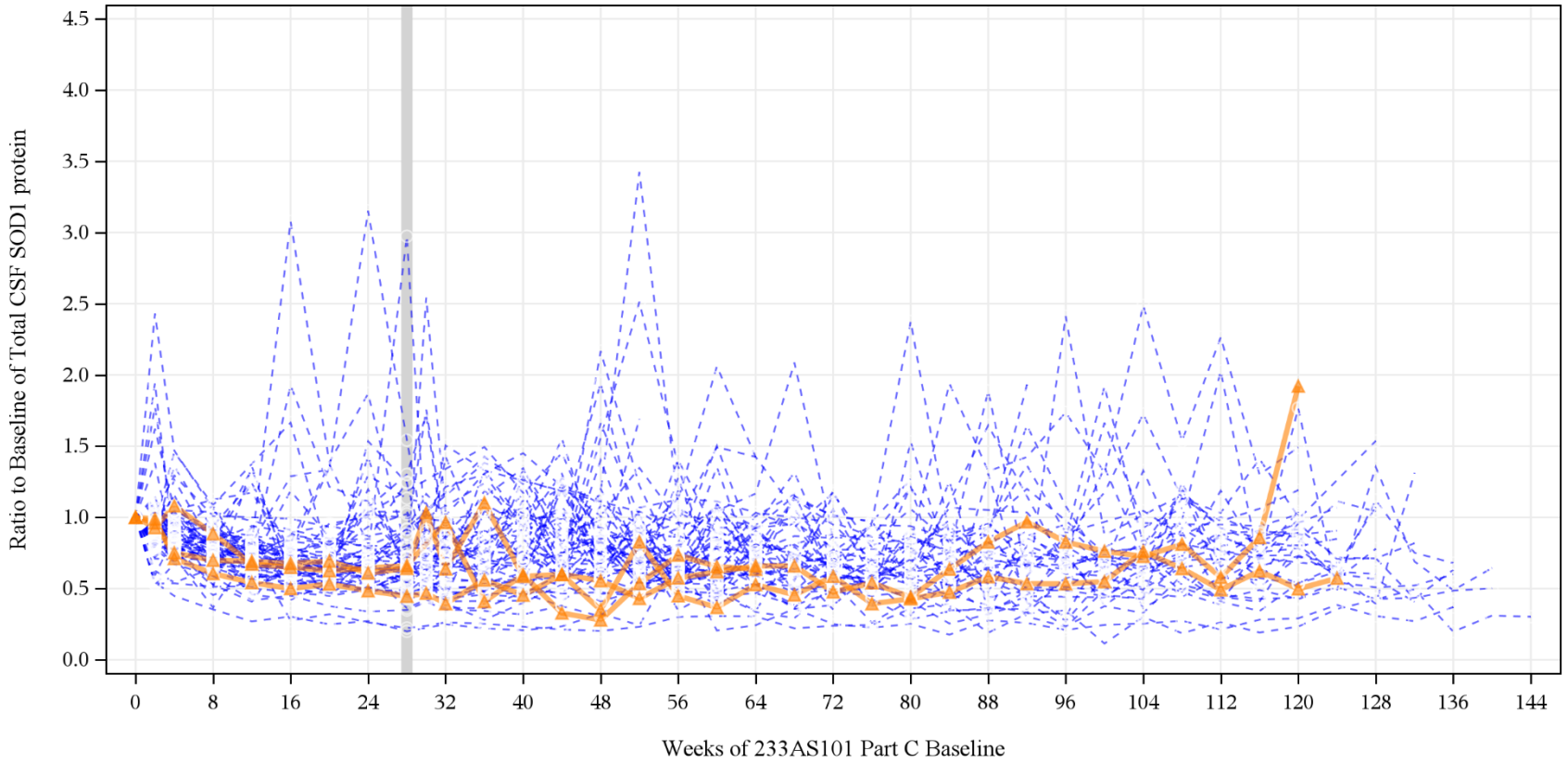
233AS101 and 233AS102 ISE: Line plot of total CSF SOD1 protein LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by time point from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 2 of 2

NOTE 1: Baseline is defined as day 1 value prior to the study drug. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.
NOTE 2: Lower limit of quantitation (LLOQ) is 15.6 ng/mL.
NOTE 3: Multiple imputation including treatment group, use of riluzole or edaravone, and the relevant baseline and postbaseline values for the endpoint is used for missing data.
NOTE 4: The analysis is based on ANCOVA model with natural log transformed data. The model includes covariates for the corresponding baseline value i.e. log value, and use of riluzole or edaravone.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid; SOD1 = superoxide dismutase 1; ANCOVA = analysis of covariance; MI = multiple imputation; LS = least square.
Source: biib067/ise/ise-bla2/f-pkpd-sod-anc-clitt.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 07APR2022

Figure 31 233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti Plot of Total CSF SOD1 Protein Ratio to 233AS101 Part C Baseline by Visit - ITT Population

Page: 1 of 3

Early-start tofersen 100 mg (N=72 including 3 Japanese participants)



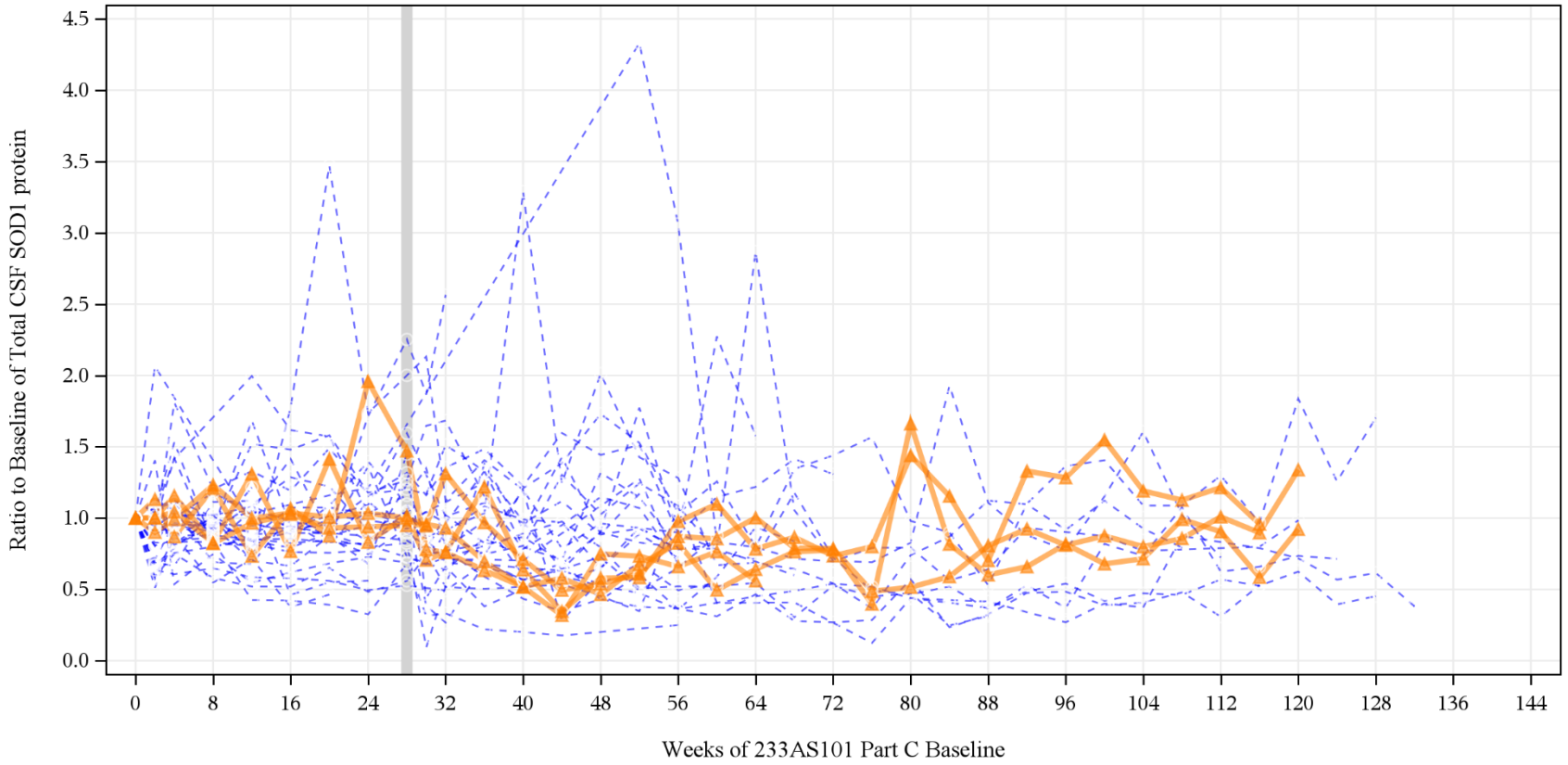
Footnotes are displayed on last page.

Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-sod-ratio-pcb-itt.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 20JUN2022

233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti plot of Total CSF SOD1 protein ratio to 233AS101 Part C baseline by visit - ITT population

Page: 2 of 3

Placebo + delayed-start tofersen 100 mg (N=36 including 4 Japanese participants)



Footnotes are displayed on last page.

Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-sod-ratio-pcb-itt.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 20JUN2022

233AS101 Part C and 233AS102: Spaghetti plot of Total CSF SOD1 protein ratio to 233AS101 Part C baseline by visit - ITT population

NOTE 1: Baseline is defined as day 1 of 233AS101 Part C value prior to the study drug and presented as Day 1. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.
NOTE 2: Lower limit of quantitation (LLOQ) is 15.6 ng/mL.
NOTE 3: If subjects had a gap between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data are excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they have no follow-up.
NOTE 4: Observed values at all visits are used.
NOTE 5: Japanese subjects are colored orange and non-Japanese subjects are colored blue.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid; SOD1 = superoxide dismutase 1
Source: biib067/japan/ia2/f-pkpd-sod-ratio-pcb-itt.sas **Data Cutoff:** 16JAN2022 **Run Date:** 20JUN2022

Table 18 Pooled Group CL: Summary of Adjusted Geometric Mean Ratio to Baseline in Total CSF SOD1 Protein at Week 52 – ITT Population

	ISE Based on 16 January 2022 Data Cutoff	
	Placebo→ delayed-start tofersen (N=36)	Early-start tofersen (N=72)
Adjusted geometric mean ratio Tof:Placebo GMR (95% CI) p-value (ANCOVA+MI)	0.79	0.67 0.86 (0.69, 1.06) 0.1631

NOTE 1: Baseline was defined as Day 1 value prior to the study drug. If Day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose was used as the baseline value.
NOTE 2: Lower limit of quantitation (LLOQ) was 15.6 ng/mL.
NOTE 3: Multiple imputation including treatment group, use of riluzole or edaravone, and the relevant baseline and postbaseline values for the endpoint was used for missing data.
NOTE 4: The analysis was based on ANCOVA model with natural log transformed data. The model included covariates for the corresponding baseline value i.e.log value, baseline disease duration since symptom onset, and use of riluzole or edaravone.
Source: ISE Appendix 3.3.1 SOD1 and Deamidated SOD1, Outputs 9.

Table 19 Pooled Group ABL – Summary of Ratio to Baseline in Total CSF SOD1 Protein at Week 104 – Long Term Tofersen 100 mg (Observed Data)

	ISE Based on 16 January 2022 Data Cutoff
N	30
Geometric mean ratio to baseline (Geometric mean ratio ± SE)	0.76 (0.71, 0.82)

NOTE 1: Baseline was defined as the last assessment prior to the first dose of tofersen 100 mg. For those with no data at Week 104 but had measurements taken at visit greater than 741 days from baseline, the first non-missing value of the corresponding endpoint taken after Day 741 was used.
NOTE 2: Lower limit of quantitation (LLOQ) was 15.6 ng/mL.
NOTE 3: If participants had a gap > 169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data from 233AS102 only was presented. If participants had a gap <= 169 days between 233AS101 end of study and 233AS102 baseline, then the data were excluded from visits between 233AS101 and 233AS102 where they had no follow-up.
Source: ISE Appendix 3.3.1 SOD1 and Deamidated SOD1, Outputs 3.

3.4.2 ニューロフィラメント

プール CL 群では、トフェルセン早期開始群で血漿中 NfL 濃度の低下が 52 週間の追跡期間中持続した（Figure 32 及び Table 20）。同様の減少は、トフェルセン開始時期が遅かったプラセボ／トフェルセン投与開始遅延群（Figure 32 及び Table 20）及び疾患進行の部分集団（ISE, Appendix 3.3.2 NfL and Combined NfL and NfH、Output 18、Output 22、及び Output 23、並びに ISE, Appendix 3.3.4 NfH、Output 15、Output 16、Output 19、及び Output 20）でも認められ、他のマトリックス及びアイソフォームでも認められた［ISE, Appendix 3.3.2 NfL and Combined Nfl and NfH、Output 8 及び Output 21、並びに ISE, Appendix 3.3.4 NfH、Output 14 及び Output 25］。

ITT 集団において、日本人集団における血漿中 NfL 濃度（オレンジ色の線）の経時的な変化は、おおむね全体集団の変動範囲内であった（Figure 33；上図：早期開始群、下図：プラセボ／投与開始遅延群）。

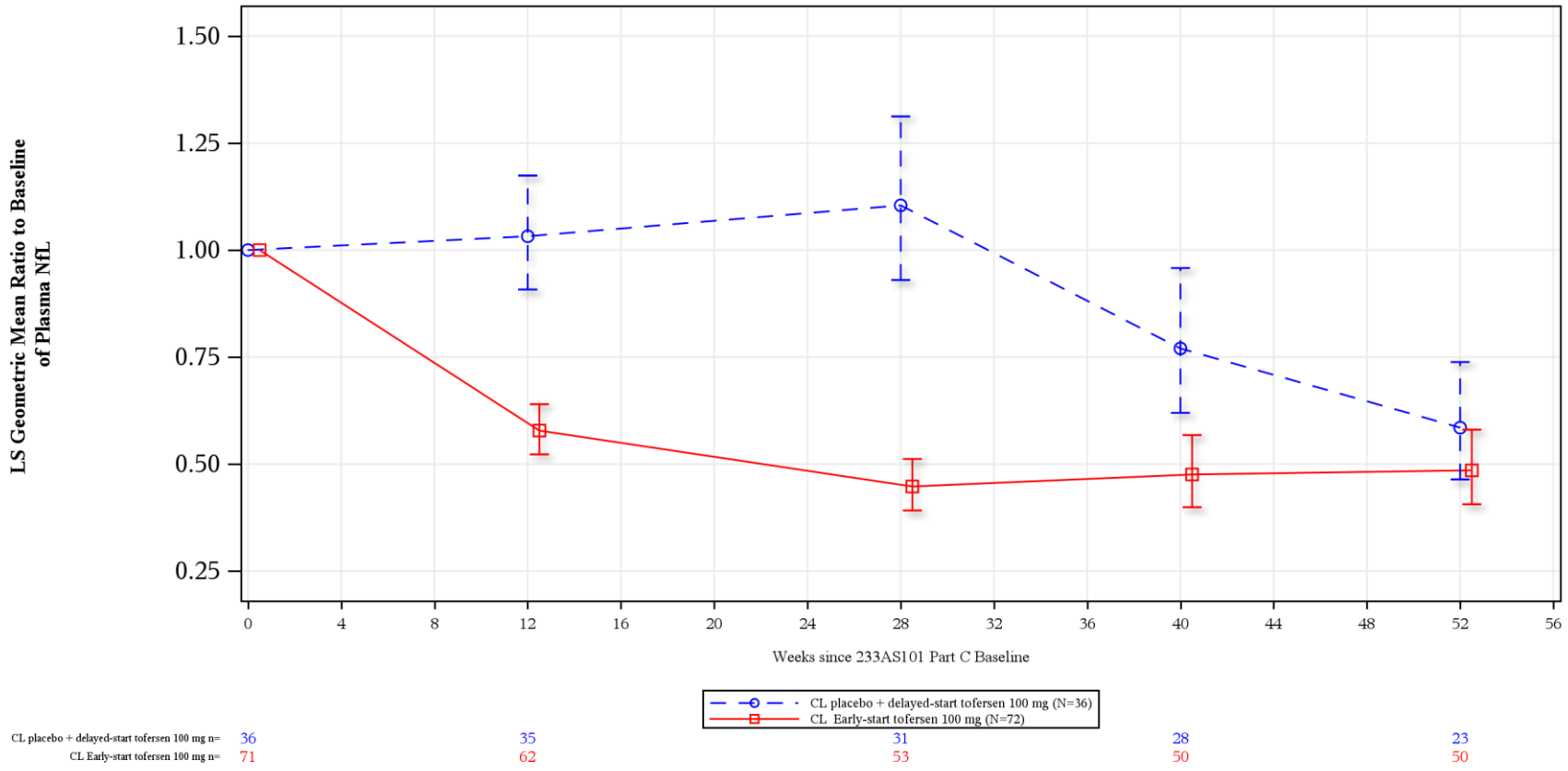
102 試験におけるパート A 及び B の被験者で観察された CSF 及び血漿中 pNfH の減少は、104 週間を超える追跡期間中持続した（Table 21）。プール ABL 群でのより長期の CSF 及び血漿中 NfL 濃度の結果は極めて限られており、Week 104 時点で解析可能であった被験者数はそれぞれ 2 例及び 0 例であった。

2022 年 1 月 16 日のデータカットでのプール CL 群及びプール ABL 群のニューロフィラメントに関する統合データは、ISE, Appendix 3.3.2 NfL and Combined NfL and NfH、Output 1～27 及び ISE, Appendix 3.3.4 NfH、Output 1～26 に示す。

2021 年 7 月 16 日のデータカットでのプール CL 群及びプール ABL 群のニューロフィラメントに関する統合データは、ISE, Appendix 2.3.2 NfL and NfH、Output 1～21 に示す。

Figure 32 Study 233AS101 and 233AS102: Line Plot of Plasma NfL Adjusted Geometric Mean Ratio to Study 101 Part C Baseline (95% CI) by Visit to Week 52 from ANCOVA+MI (ITT Population)

233AS101 and 233AS102 ISE: Line plot of plasma NfL LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by time point from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 1 of 2



Footnotes are displayed on last page.
Source: biib067/ise/ise-bla2/f-pkpd-pnfl-anc-clitt.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 07APR2022

233AS101 and 233AS102 ISE: Line plot of plasma NfL LS geometric mean ratio to baseline values (95% CI) by time point from ANCOVA analysis using MI - ITT population
Page: 2 of 2

NOTE 1: Baseline is defined as day 1 value prior to the study drug. If day 1 value is missing, the non-missing value (including screening visit) closest to and prior to the first dose will be used as the baseline value.
NOTE 2: Lower limit of quantitation (LLOQ) is 4.9 pg/mL. Values below limit of quantitation (BLQ) are set to half of LLOQ in calculations.
NOTE 3: Multiple imputation including treatment group, use of riluzole or edaravone, and the relevant baseline and postbaseline values for the endpoint is used for missing data. An extreme value of 477 pg/mL is set to missing and is imputed with multiple imputation in the ANCOVA analysis.
NOTE 4: The analysis is based on ANCOVA model with natural log transformed data. The model includes covariates for the corresponding baseline value i.e. log value, and use of riluzole or edaravone.
Abbreviations: NfL = neurofilament light chain; ANCOVA = analysis of covariance; MI = multiple imputation; LS = least square.
Source: biib067/ise/ise-bla2/f-pkpd-pnfl-anc-clitt.sas Data Cutoff: 16JAN2022 Run Date: 07APR2022