2.4 非臨床試験の概括評価

目　次

目　次 2
表 一 覧 3
図 一 覧 3
略号一覧 4
補足事項 5
1 緒言 6
2 非臨床試験計画の概要及び GLP 適合性 7
3 薬理試験 8
3.1 効力を裏付ける試験 9
3.1.1 *In vitro* 薬理試験 9
3.1.2 *In vivo* 薬理試験 10
3.2 副次的薬理試験 12
3.2.1 *In vitro* 薬理試験 12
3.2.2 ブラジキニンの作用に対する影響の評価 13
3.3 安全性薬理試験 13
3.4 薬力学的薬物相互作用試験 13
4 薬物動態試験 13
4.1 分析法 14
4.2 吸収及び生物学的利用性 14
4.3 分布 15
4.4 胎児移行及び乳汁中移行 16
4.5 代謝 16
4.6 排泄 18
4.7 薬物動態学的薬物相互作用 19
4.7.1 酵素阻害 19
4.7.2 酵素誘導 19
4.7.3 トランスポーター 19
4.8 トキシコキネティクス 20
5 毒性試験 21
5.1 単回投与毒性試験 21
5.2 反復投与毒性試験 21
5.3 遺伝毒性試験 24
5.4 がん原性試験 25
5.5 生殖発生毒性試験 26
5.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 26

5.5.2 胚・胎児発生に関する試験 27
5.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 27
5.5.4 幼若動物を用いた試験 28
5.5.5 生殖発生毒性試験の総合評価 28
5.6 曝露量の比較 29
5.7 局所刺激性試験 33
5.8 その他の毒性試験 33
5.8.1 免疫毒性試験 33
5.8.2 光毒性試験 33
5.8.3 NEP 基質への影響に関する探索的試験 33
6 不純物及び分解物 34
7 安全性の総合評価 35
8 結論 37
9 参考文献 38

表 一 覧

Table 4-1 [^{14}C]AHU 又は[^{14}C]LCZ を単回経口投与したときの用量補正後の血漿中又は血液中 Cmax 及び AUC 15
Table 4-2 LBQ の血漿又は血液クリアランス並びに定常状態における分布容積 15
Table 5-1 AHU の単回投与毒性試験 21
Table 5-2 LCZ の反復投与毒性試験 22
Table 5-3 LCZ，AHU 及び LBQ の遺伝毒性試験 25
Table 5-4 AHU のがん原性試験 26
Table 5-5 LCZ 及び AHU の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 26
Table 5-6 LCZ 及び AHU の胚・胎児発生に関する試験 27
Table 5-7 AHU の出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験 27
Table 5-8 幼若動物を用いた毒性試験 28
Table 5-9 LCZ 200 mg を 1 日 2 回投与した心不全患者における曝露量の要約 29
Table 5-10 LCZ の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比 30
Table 5-11 AHU の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比 31

図 一 覧

Figure 1-1 LCZ の構造式 7
Figure 1-2 LCZ の 3 次元構造 7
Figure 4-1 AHU の *in vitro* 代謝経路 16

Figure 4-2 AHU 及び LBQ の推定代謝経路 18

略号一覧

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
Aβ	amyloid beta	アミロイドβ
ACE	angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収，分布，代謝，及び排泄
Ang I	angiotensin I	アンジオテンシン I
Ang II	angiotensin II	アンジオテンシン II
ANP	atrial natriuretic peptide	心房性ナトリウム利尿ペプチド
APP	amyloid precursor protein	アミロイド前駆体蛋白
APP-2	aminopeptidase P-2	アミノペプチダーゼ P-2
ARB	angiotensin II receptor, type 1 blocker	AT_1 受容体拮抗薬
ARNI	angiotensin receptor neprilysin inhibitor	アンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬
AT_1 receptor	angiotensin II receptor, type 1	アンジオテンシン II 1 型受容体
AT_2 receptor	angiotensin II receptor, type 2	アンジオテンシン II 2 型受容体
AUC	area under the drug serum concentration-time curve	血清中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC0-t	area under the drug plasma (serum/blood) concentration-time curve (time 0 to t)	血漿（血清/血液）中薬物濃度-時間曲線下面積（時間 0～t）
AUCinf	area under the serum concentration-time curve (time 0 to infinity)	血清中濃度-時間曲線下面積（0～無限大）
BK	bradykinin	ブラジキニン
BNP	brain natriuretic peptide	脳性ナトリウム利尿ペプチド
BUN	blood urea nitrogen	血液尿素窒素
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	環状グアノシン一リン酸
Cmax	maximum serum concentration	最高血清中薬物濃度
CNP	C-type natriuretic peptide	C 型ナトリウム利尿ペプチド
CSF	cerebral spinal fluid	脳脊髄液
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4	ジペプチジルペプチダーゼ-4
DSS	Dahl salt-sensitive	Dahl 食塩感受性
dTGR	double-transgenic rat overexpressing human renin and angiotensinogen	ヒトレニン及びヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子を導入したダブルトランスジェニックラット
ECE-2	endothelin converting enzyme-2	エンドセリン変換酵素-2
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ERPF	effective renal plasma flow	有効腎血漿流量
GFR	glomerular filtration rate	糸球体濾過率
GLP	good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GPCR	G protein-coupled receptor	G 蛋白質共役型受容体
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
IC_{50}	half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
KIM-1	kidney injury molecule-1	腎障害分子-1
MMP-2	matrix metalloproteinase-2	マトリックスメタロプロテアーゼ-2
NEP	neprilysin; neutral endopeptidase 24.11	ネプリライシン；中性エンドペプチダーゼ 24.11
NEP-2	neprilysin-2	ネプリライシン-2
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin	好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン
NP	natriuretic peptide	ナトリウム利尿ペプチド
NPR-A	natriuretic peptide receptor-A	ナトリウム利尿ペプチド受容体-A
NT-proANP	N-terminal pro-atrial natriuretic peptide	N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド
PRA	plasma renin activity	血漿レニン活性
RAAS	renin-angiotensin-aldosterone system	レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系
SHR	spontaneously hypertensive rat	高血圧自然発症ラット
SHRSP	stroke-prone spontaneously hypertensive rat	脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット
TIMP-2	tissue inhibitor of metalloproteinases-2	組織メタロプロテアーゼ阻害物質-2

補足事項

用語	定義
薬剤名の表記方法	文章及び図表中では以下の表記を用いた。

一般名	本書での表記
サクビトリルバルサルタンナトリウム水和物（LCZ696）	LCZ
サクビトリル（AHU377）	AHU
Sacubitrilat（LBQ657）	LBQ
バルサルタン（VAL149）	VAL
ロサルタン	LOS
ヒドロクロロチアジド	HCTZ
エナラプリル	ENA
ベナゼプリル	BEN

被験物質の検討濃度及び用量に関する表記	本概括評価に記載した化合物の検討濃度及び用量については遊離塩基で表記し，遊離塩基ではない場合は換算係数に基づき遊離塩基換算量を括弧内に併記した。また，公表文献については記載内容に基づき表記した。LCZ の三ナトリウムヘミ五水和物及びナトリウム無水和物の換算係数については 1.131 及び 1.078，AHU のナトリウム塩及びカルシウム塩の換算係数については 1.053 及び 1.046 を用いた。

1 緒言

サクビトリルバルサルタンナトリウム水和物（開発コード：LCZ696）は，アンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬（angiotensin receptor neprilysin inhibitor，ARNI）に分類される世界で初めての薬剤であり，国内では「慢性心不全」及び「高血圧症」を目標適応症として開発が進められた。

LCZ は，[redacted]個のサクビトリル構造部（アニオン），[redacted]個のバルサルタン構造部（アニオン），[redacted]個のナトリウムカチオン，及び[redacted]個の水分子から複合体を形成しており，化学名は Monosodium 4-{[(2*S*,4*R*)-1-(biphenyl-4-yl)-5-ethoxy-4-methyl-5-oxopentan-2-yl]amino}-4-oxobutanoate—disodium (2*S*)-3-methyl-2-(*N*-{[2'-(1*H*-tetrazol-1-id-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl}pentanamido)butanoate (1/1) hemipentahydrate である。LCZ の構造式及び 3 次元構造を Figure 1-1及びFigure 1-2に示す。

LCZ は，投与後速やかに溶解し，AHU 及び VAL に解離する。AHU はプロドラッグであり，エステラーゼにより加水分解され，ネプリライシン（中性エンドペプチダーゼ 24.11，neprilysin，NEP）に対して強力かつ選択的な阻害作用を有する LBQ に変換される。また，VAL はアンジオテンシン II 1 型（angiotensin II receptor, type 1，AT_1）受容体拮抗作用を有する。したがって，LCZ は NEP 阻害作用によりナトリウム利尿ペプチド（natriuretic peptide，NP）の濃度を上昇させる（NP 系亢進）とともに，AT_1 受容体拮抗作用によりレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（renin-angiotensin-aldosterone system，RAAS）を抑制する。LCZ は ARNI として，NP の作用を亢進させるだけでなく，RAAS を抑制することにより，これらの単一の作用に比べてより優れた心血管系及び腎臓に対する保護作用を持つことが示されたことから慢性心不全適応への有用性が期待される。

慢性心不全患者における LCZ の安全性，忍容性，薬物動態，並びに有効性の発現時間及び持続期間については，臨床第 II 相及び第 III 相試験で評価されており，これまでの臨床試験の結果から，本剤の用量及び用法は「通常，成人にはサクビトリルバルサルタンとして 1 回 50 mg を開始用量として 1 日 2 回経口投与する。忍容性が認められる場合は，2～4 週間の間隔で段階的に 1 回 200 mg まで増量する。1 回投与量は 50 mg，100 mg，又は 200 mg とし，いずれの投与量においても 1 日 2 回経口投与する。なお，忍容性に応じて適宜減量する。」とすることを予定している。LCZ 400 mg の用量は，AHU 約 200 mg 及び VAL 約 200 mg の用量に相当する。非臨床試験の概括評価では，LCZ の予定最高臨床用量（200 mg 1 日 2 回）における曝露量を用いて，各非臨床試験における曝露量と比較した。

この非臨床試験の概括評価では，薬理試験，薬物動態試験，及び毒性試験の結果から，LCZ の非臨床における有効性及び安全性を総合的に評価して記載した。

Figure 1-1 LCZ の構造式

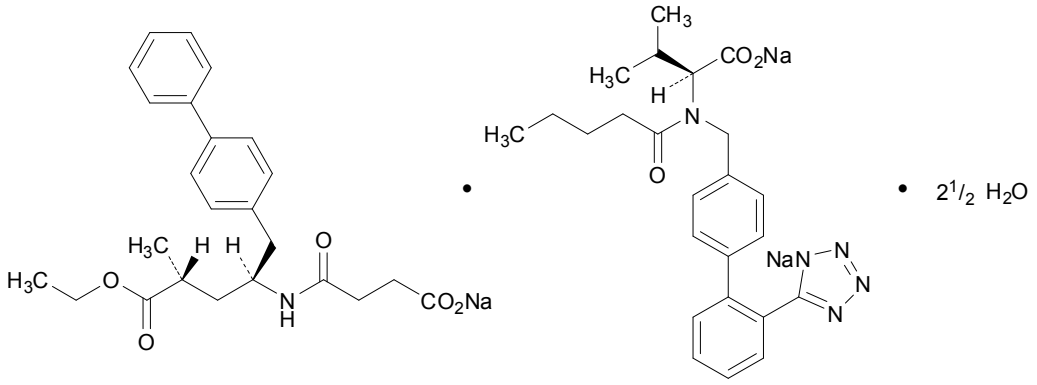
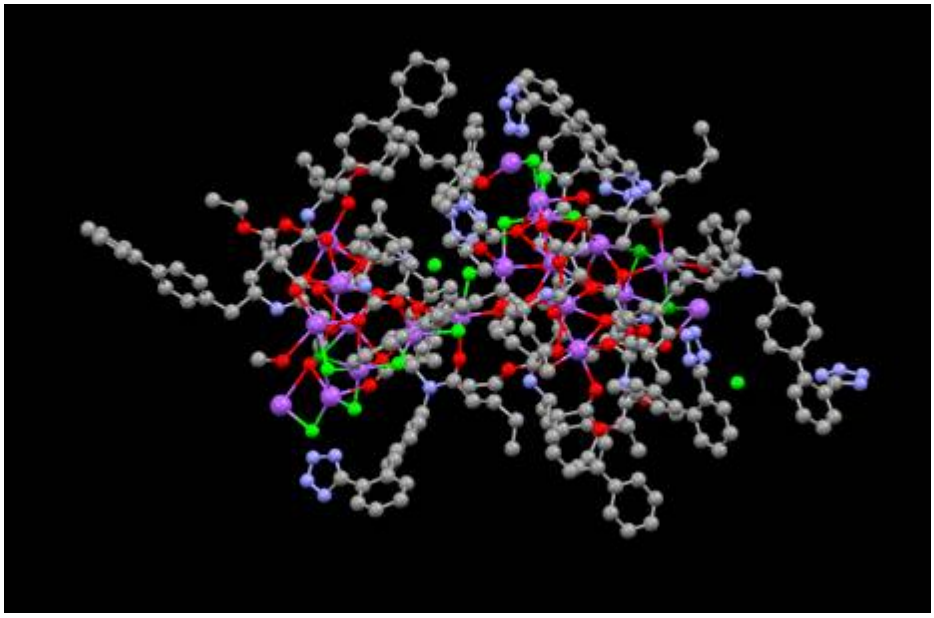


Figure 1-2 LCZ の 3 次元構造



LCZ の非対称単位格子と水分子の位置を示す。各凡例は，炭素（灰色），窒素（青），酸素（赤），ナトリウム（紫），及び水分子（緑）を示す。水素原子は表記していない。

2 非臨床試験計画の概要及び GLP 適合性

LCZ の標的分子である NEP 及び AT_1 受容体をコードする遺伝子は種を超えて広く保存されていることから，非臨床試験ではさまざまな動物種（マウス，ラット，ウサギ，イヌ，及びサル）を用いて評価した。LCZ の非臨床試験（薬理試験，薬物動態試験，及び毒性試験）は，すべてノバルティス社又は受託研究機関の試験施設で実施した。

LCZ の薬理活性及び選択性は，LCZ，AHU，LBQ 又は VAL の *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験により検討した。これらの試験では複数の心臓及び腎疾患モデル動物を使用し，LCZ の心血管系及び腎臓に対する保護作用並びに降圧作用について検討した。LCZ の安全性薬理試験として，LCZ 及び AHU の心血管系，呼吸系及び中枢神経系に関する試験，並びに LBQ の心血管系に関する試

験を実施した。主要な安全性薬理試験は，医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use，ICH）ガイドライン S7A 及び S7B に従い，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good laboratory practice，GLP）に準拠して実施した。

LCZ の非臨床薬物動態試験として，反復投与毒性試験に使用した動物種（マウス，ラット及びサル）を対象とした放射性標識 ADME 試験を実施した。すべての動物種について経口及び静脈内投与により評価し，吸収率及びバイオアベイラビリティを推定した。さらに，薬物動態パラメータ，排泄経路及び排泄率，代謝経路，組織内分布，胎盤移行，及び乳汁移行に関して評価した。LCZ 投与後に *in vivo* で検出された主要構成成分（AHU，LBQ，及び VAL）について *in vitro* 試験を実施し，血球移行，血漿蛋白結合率，酵素阻害，及び酵素誘導並びに薬物トランスポーターの寄与を評価した。

LCZ の毒性プロファイルは，LCZ，AHU，LBQ，及び VAL の毒性試験成績を用いて総合的に評価した。毒性試験として，単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，がん原性試験，生殖発生毒性試験，局所刺激性試験，及びその他の毒性試験を実施した。主要な毒性試験は ICH M3(R2) ガイドライン（医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施 についてのガイダンス），米国食品医薬品局（Food and Drug Administration，FDA）の代謝物の安全性評価に関するガイダンス（FDA Guidance on Safety Testing of Metabolites，February 2008），及びその他の安全性に関する ICH ガイドラインに従い，GLP に準拠して実施した。

3 薬理試験

NEP は，膜貫通型メタロエンドペプチダーゼであり，5 kDa 未満のペプチドに作用して疎水性アミノ酸残基の N 末端側でペプチドの切断を行う。NEP は生理活性ペプチドを分解・不活化し，ペプチドによる細胞表面シグナル伝達を遮断する重要な役割を担っている。NEP の分布は，哺乳類において，脳，肺，腎臓，精巣といった組織から，血管内皮細胞，血管平滑筋細胞，心筋細胞，線維芽細胞，好中球，及び脂肪細胞等幅広く，近位尿細管において比較的強い発現が認められている（Mangiafico et al. 2013）。現時点で確認されている NEP の基質として，エンケファリン，タキキニン，走化性ペプチド，アドレノメデュリン，及び NP 等がある。特に，NEP は心房性ナトリウム利尿ペプチド（atrial natriuretic peptide，ANP）及び C 型ナトリウム利尿ペプチド（C-type natriuretic peptide，CNP）の分解及び不活化に重要な役割を果たしており，ANP の血中半減期は 2～3 分間と非常に短い。また，NEP は脳性ナトリウム利尿ペプチド（brain natriuretic peptide，BNP）の不活化に対しても関与していると考えられている。以上から，NEP を阻害することにより，循環血中の NP 濃度を上昇させ（NP 系亢進），血圧低下，血管拡張，利尿，尿中ナトリウム排泄，糸球体ろ過量及び腎血流量の増加，レニン及びアルドステロン分泌抑制，交感神経系抑制，心肥大抑制，及び線維化抑制等の作用を示すと考えられる（Kuhn 2009，Potter et al. 2009，Porzionato et al. 2010，de Bold 2011，Kishimoto et al. 2011）。

AT_1 受容体は主に脳，副腎，心臓，血管，及び腎臓に発現し，アンジオテンシン II（Ang II）との結合を介して血圧及び電解質バランスを調節している。VAL は AT_1 受容体を競合阻害することにより，血管収縮抑制，アルドステロン分泌抑制，ナトリウム及び体液貯留の減少，並びに心血管肥大，及びリモデリングの抑制等の作用を示す。

LCZ は ARNI として，NP の作用を亢進させるだけでなく，RAAS を抑制することにより，これらの単一の作用に比べてより優れた心血管系及び腎臓に対する保護作用を有することから慢性心不全適応への有用性が期待される。

3.1 効力を裏付ける試験

3.1.1 *In vitro* 薬理試験

LCZ 投与後に *in vivo* で検出された主要構成成分（AHU，LBQ，及び VAL）について *in vitro* 薬理試験を実施した。

NEP 阻害作用及び AT_1 受容体拮抗作用

プロドラッグである AHU のヒト NEP に対する阻害作用は弱く，IC_{50} 値は 16.7 µM であった。一方，AHU の活性代謝物である LBQ は強力なヒト NEP 阻害作用を示し，IC_{50} 値は 2.3 nM であった。AHU 及び LBQ はいずれもヒト NEP-2 に対する阻害作用が弱く，IC_{50} 値はそれぞれ 100 µM 以上及び 84.7 µM であった。VAL のヒト NEP 及び NEP-2 に対する IC_{50} 値は 100 µM 以上であった [2.6.2-2.1.1.1 項]，[2.6.2-Table 2-1]。

腎皮質膜画分の NEP 活性に対する阻害作用についても検討した。LBQ のラット腎皮質膜画分における NEP 阻害作用の IC_{50} 値は 1.4 nM であり，ヒト腎皮質膜画分における IC_{50} 値は 7.3 nM であった [2.6.2-2.1.1.1 項]。また，ヒト血漿及び脳脊髄液サンプルを用いて NEP 阻害作用を検討したところ，LBQ の IC_{50} 値はそれぞれ 2500 nM 及び 54 nM であり，ヒト腎皮質膜画分を用いたときよりも IC_{50} が高値であった [2.6.2-2.1.1.1 項]。

VAL は選択的かつ競合的な AT_1 受容体拮抗作用を有しており，ラット大動脈平滑筋細胞膜画分において Ang II の AT_1 受容体への結合を拮抗阻害し，その Ki 値は 2.38 nM であった。また，VAL の AT_1 受容体の選択性は，AT_2 受容体に対して約 30000 倍高かった（Criscione et al. 1993），[2.6.2-2.1.1.2 項]。AHU 及び LBQ のヒト AT_1 受容体に対する拮抗作用は弱く，IC_{50} 値はいずれも 30 µM 以上であった [2.6.2-2.1.1.2 項]。

臓器保護に関する作用

Ang II を介して誘発されたラット心臓線維芽細胞のコラーゲン産生及び心筋細胞の肥大に対して，LBQ 及び VAL の併用処置による抑制作用がみられ，その作用は LBQ 又は VAL の単独処置に比べて強かった（von Lueder et al. 2013，[2.6.2-2.2.1 項]，[2.6.2-2.2.2 項]，[2.6.2-Figure 2-3]，[2.6.2-Figure 2-4]）。

RAAS に関する作用

ウシ副腎細胞から分離した球状帯細胞を用いた Ang II 誘発アルドステロン分泌に対して，VAL は EC_{50} 値 49 nM で阻害した。また，Ang II 誘発濃度（0.1～10 nM）において，VAL は 300 nM でアルドステロン分泌を対照群のレベルまで抑制した [2.6.2-2.2.3 項]。

VAL は，Ang II（100 nM）により亢進されるラット摘出左心房標本の電気刺激によるノルアドレナリン分泌を強力に阻害し，IC_{50} 値は 7 nM であった [2.6.2-2.2.4 項]。

3.1.2 *In vivo* 薬理試験

LCZ の活性代謝物である LBQ は NEP を阻害し，各種 NP の濃度を上昇させる。また，LCZ のもう一つの活性体である VAL は AT_1 受容体拮抗作用を有し，Ang II により誘発される血管収縮，細胞増殖，及びアルドステロン分泌といった作用を抑制する。LCZ は NEP 阻害作用及び AT_1 受容体拮抗作用を併せ持つことから，これらの単一の作用に比べてより優れた心血管系及び腎臓に対する保護作用を持つことが示された。以下に *in vivo* 薬理試験の概要を記載する。

NEP 阻害作用及び AT_1 受容体拮抗作用

ラットに AHU 30 mg/kg（遊離塩基換算量 28.5 mgEq/kg）を単回経口投与したとき，腎皮質における NEP 活性が 73%阻害された [2.6.2-2.3.1 項]。ラットに LCZ 60 mg/kg を単回経口投与したとき，持続静注した ANP の血漿中濃度は 232%まで上昇し，その上昇作用は投与後 8 時間持続した [2.6.2-2.3.3.1 項]，[2.6.2-Table 2-2]。

ラットに VAL 10 mg/kg を単回経口投与したとき，投与後 4 時間の外因性 Ang II による昇圧反応曲線は，溶媒投与と比較して 100 倍濃度右方シフトした。また，投与後 24 時間においても 10 倍濃度の右方シフトが維持され，VAL の持続的な Ang II 拮抗作用が示された（Criscione et al. 1993，[2.6.2-6.1 項]）。

LCZ による NP 系及び RAAS への作用

高食塩を負荷した Dahl 食塩感受性（Dahl salt-sensitive，DSS）ラットでは正常食塩群と比較して尿中環状グアノシン一リン酸（cyclic guanosine monophosphate，cGMP）値の上昇がみられ，LCZ を 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）の用量で経口投与したときもその上昇は維持された [2.6.2-2.6.2.1 項]，[2.6.2-Figure 2-16]。LCZ 投与後の cGMP 値の上昇維持は，循環血中 ANP の上昇及び NP 受容体-A（natriuretic peptide receptor-A，NPR-A）を介したグアニル酸シクラーゼ活性亢進によるものと考えられた。一方，HCTZ 及び LOS/HCTZ の併用投与は，初回投与後に尿中 cGMP 値を低下させており，これには血圧低下による循環血中の ANP 低下が関与しているものと考えられた。低ナトリウム食飼育イヌにおいて，LCZ 45 mg/kg（遊離塩基換算量 42 mgEq/kg）の経口投与により血漿中 cGMP 値の上昇が認められたが，BEN 及び VAL 投与による血漿中 cGMP への作用は認められなかった [2.6.2-2.6.2.3 項]，[2.6.2-Figure 2-20]。

LCZ を低ナトリウム食飼育イヌに投与したときに認められた RAAS 構成因子への影響には，AT_1 受容体拮抗作用とともに NEP 阻害の関与が考えられた。低ナトリウム食飼育イヌに LCZ を投与したときに得られた知見を以下に示す。

- VAL 60 mg/kg 及び同等の VAL の曝露量が得られる LCZ 45 mg/kg（遊離塩基換算量 42 mgEq/kg）を低ナトリウム食飼育イヌに投与したとき，血漿レニン活性（plasma renin activity，PRA）及び血漿中アンジオテンシン I（Ang I）値はともに上昇したが，LCZ の PRA 上昇作用は VAL に比べて弱かった [2.6.2-2.6.2.3 項]，[2.6.2-Figure 2-17]。これは，LCZ の NEP 阻害により上昇した血漿中 ANP がレニンの分泌を抑制したためと考えられる。
- LCZ 45 mg/kg（遊離塩基換算量 42 mgEq/kg）及び VAL 60 mg/kg はともに低ナトリウム食飼育イヌのアルドステロン値を抑制したが，その作用は LCZ の方が強かった。LCZ の低用量である 15 mg/kg（遊離塩基換算量 14 mgEq/kg）のアルドステロン分泌抑制作用が最も強く，VAL に比べて 2 倍程度強かった [2.6.2-2.6.2.3 項]，[2.6.2-Figure 2-19]。

LCZ の心血管系及び腎臓に対する臓器保護作用

LCZ は高食塩負荷 DSS ラットの左室重量増加を有意に抑制し，N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド（N-terminal pro-atrial natriuretic peptide，NT-proANP）の上昇も抑制した。LCZ は左室肥大を抑制し，それにより心房伸展が軽減されたため，NT-proANP の上昇が抑制されたものと考えられる。一方，LOS の NT-proANP に対する作用は LCZ に比べて弱かった [2.6.2-2.5.1 項]，[2.6.2-Figure 2-8]。

LCZ は冠動脈結紮心筋梗塞モデルラットにおいて，心臓重量の減少作用を示し，心筋梗塞後のリモデリングに対する抑制作用が示唆された（von Lueder et al. 2013，[2.6.2-2.5.2 項]，[2.6.2-Figure 2-11]）。

血管に対する作用として，脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（stroke-prone spontaneously hypertensive rat，SHRSP）でみられる冠動脈中膜肥厚並びに血管周囲間質のコラーゲン沈着，血管壁へのマクロファージ浸潤，及びマトリックスメタロプロテアーゼ-2（matrix metalloproteinase-2，MMP-2）／組織メタロプロテアーゼ阻害物質-2（tissue inhibitor of metalloproteinases-2，TIMP-2）のバランス異常を含む血管リモデリングに対して，NEP 阻害剤と VAL の併用投与は VAL 単独投与と比べて強い改善作用を示した（Pu et al. 2008，[2.6.2-2.5.4 項]，[2.6.2-Figure 2-13]，[2.6.2-Figure 2-14]）。

LCZ は，高食塩負荷 DSS ラットでみられる腎血流量減少並びに腎血管抵抗上昇を抑制し，糸球体濾過率（glomerular filtration rate，GFR）及び有効腎血漿流量（effective renal plasma flow，ERPF）等の腎機能パラメータを有意に改善し，さらに降圧作用を示した。LCZ の ERPF 減少に対する効果は，LOS 又は HCTZ よりも優れていた。また，高食塩負荷による血液尿素窒素（blood urea nitrogen，BUN）の上昇も LCZ の投与により有意に抑制された。腎機能の改善に伴

い，腎障害バイオマーカーである腎障害分子-1（kidney injury molecule-1，KIM-1）及び好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin，NGAL）の低下がみられたことから，高食塩負荷により誘発される腎障害に対する LCZ の保護作用が示唆された [2.6.2-2.5.1 項]，[2.6.2-Figure 2-9]，[2.6.2-Figure 2-10]，[2.6.2-Table 2-4]。

これらの結果から，心血管障害及び腎障害に対する NEP 及び AT_1 受容体の同時阻害の有用性が示唆された。

LCZ の降圧作用

ヒトレニン及びヒトアンジオテンシノーゲン遺伝子を導入し，持続的な血漿レニン及び Ang II の上昇を呈するダブルトランスジェニックラット（double-transgenic rat overexpressing human renin and angiotensinogen，dTGR）に LCZ の 2～60 mg/kg を単回経口投与したところ，平均動脈圧の用量依存的な低下がみられた [2.6.2-2.5.7 項]，[2.6.2-Table 2-5]。

高血圧自然発症ラット（spontaneously hypertensive rat，SHR）に LCZ の 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）を 2 週間反復経口投与したところ，投与期間中持続した動脈圧低下がみられた [2.6.2-2.5.7 項]，[2.6.2-Table 2-5]。

食塩感受性高血圧モデルである DSS ラットに，LCZ を 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）の用量で 4 週間反復経口投与したところ，高食塩負荷により誘発された平均動脈圧上昇は完全に抑制された [2.6.2-2.4.1 項]，[2.6.2-Figure 2-6]。

3.2 副次的薬理試験

3.2.1 *In vitro* 薬理試験

AHU，LBQ，及び VAL 並びに対照薬であるオマパトリラトについて，NEP や NP 及び RAAS 経路に関わる 10 種類のプロテアーゼに対する阻害作用を評価した。LBQ は NEP を強力に阻害し（IC_{50} 値：2.3 nM），エンドセリン変換酵素-2（endothelin converting enzyme-2，ECE-2）も阻害した（IC_{50} 値：5.5 µM）。しかしながら，その作用は NEP 阻害作用よりも 2000 倍以上弱く，意味のある阻害作用ではなかった。このほか，AHU，LBQ，及び VAL は検討したプロテアーゼに対して明らかな阻害作用を示さず（IC_{50} 値はいずれも 100 µM 以上），LBQ の NEP 選択的な阻害作用が確認された。一方，オマパトリラトは ACE に対して強い阻害作用を示し（IC_{50} 値：1.4 nM），NEP-2 及びアミノペプチダーゼ P-2（aminopeptidase P-2，APP-2）に対しても阻害作用（IC_{50} 値：700 nM 及び 600 nM）を示したことから，比較的非選択的な ACE 阻害剤であることが明らかとなった [2.6.2-2.1.1.1 項]，[2.6.2-3.1 項]，[2.6.2-Table 2-1]，[2.6.2-Table 3-1]。

AHU，LBQ，及び VAL について，G 蛋白質共役型受容体（G protein-coupled receptor，GPCR），トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体，及び酵素のパネルを用いてオフターゲットに対する作用を検討したところ，30 µM の AHU，10 µM 以上の LBQ，または 10 µM の VAL は評価したいずれの標的に対しても明確な阻害作用を示さなかった [2.6.2-3.1 項]。

3.2.2 ブラジキニンの作用に対する影響の評価

ブラジキニン（bradykinin，BK）は血管拡張，尿中ナトリウム排泄作用，及び血管透過性亢進作用を有するペプチドホルモンである。BK の分解作用は ACE が最も強く，アミロイド前駆体蛋白（amyloid precursor protein，APP），NEP，ジペプチジルペプチダーゼ-4（dipeptidyl peptidase-4，DPP-4），及びキニナーゼ 1 といったその他の酵素も BK を不活化することが知られている。BK の過剰な産生に伴い血管浮腫が生じる場合があり，オマパトリラトにより誘発される血管浮腫の主な機序と考えられている。そこで，AHU 単独又は AHU と VAL の併用での BK の生体作用に対する増強の有無を検討するため，BK 誘発ラット足浮腫モデル及び BK 注入ラットにおける血圧低下に対する作用を検討した。いずれの試験においても，AHU は VAL の存在下で BK の作用を増強しないことが示された。一方，ACE 阻害薬である ENA 又はオマパトリラトは，これらのモデルにおいて BK の作用を増強した [2.6.2-3.2.1 項]，[2.6.2-3.2.2 項]。

3.3 安全性薬理試験

LCZ の安全性薬理試験として，*in vitro* 電気生理学的試験，サルを用いた心血管系に関するテレメトリー試験，並びにラットを用いた呼吸系及び中枢神経系に関する試験を実施した。また，AHU の安全性薬理試験として，*in vitro* 電気生理学的試験，イヌを用いた心血管系に関するテレメトリー試験，ラットを用いた呼吸系に関する試験，及びマウスを用いた中枢神経系に関する試験を実施した。さらに，LBQ の *in vitro* 電気生理学的試験を実施した。*In vitro* 電気生理学的試験では，LCZ 処理により hERG 電流の軽微な阻害がみられたが，IC_{50} 値は最高濃度の 3000 μM 超であった [2.6.2-4.1.1 項]。AHU 処理による hERG チャネルへの影響はみられず [2.6.2-4.1.3 項]，LBQ 処理により hERG 電流の軽微な阻害がみられたが，IC_{50} 値は最高濃度の 1000 μM 超であった [2.6.2-4.1.5 項]。LCZ 及び AHU 投与に関連した呼吸系及び中枢神経系に対する影響は認められなかった[2.6.2-4.2 項]，[2.6.2-4.3 項]。LCZ のサルを用いた心血管系に関する試験では，100 mg/kg の用量で薬理作用に関連した血圧の軽度低下がみられたが，心拍数及び心電図の異常は認められなかった[2.6.2-4.1.2 項]。AHU のイヌを用いた心血管系に関する試験では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった [2.6.2-4.1.4 項]。

3.4 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

4 薬物動態試験

LCZ は経口投与後，AHU と VAL に解離して吸収され，さらに AHU は NEP 阻害活性を有する LBQ に変換される。したがって，本項では LCZ 由来の成分である AHU，LBQ 及び VAL それぞれの薬物動態について要約する。

4.1 分析法

In vitro 及び *in vivo* 試験に用いた標識体として，カルボキシプロピオニルアミノ基の 2 つのカルボニル基に ^{14}C 標識した[^{14}C]LCZ，[^{14}C]AHU 及び[^{14}C]LBQ を調製した[2.6.4-2.1 項]。放射活性は液体シンチレーションカウンターを用いて測定し，一部の代謝物同定試験においては，マイクロプレートシンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。AHU，LBQ 及び VAL 測定時の内部標準物質として，$^{13}C_4$-標識 AHU，$^{13}C_4$-標識 LBQ 及び D_9-標識 VAL の安定同位体を調製し，使用した。

LCZ 由来の成分（AHU，LBQ 及び VAL）の血漿中濃度及び組織内濃度は，タンデム質量分析装置を接続した液体クロマトグラフィー（LC-MS/MS）により測定した [2.6.4-2.3 項]。^{14}C 標識体を投与後の動物及びヒトにおける尿及び糞中濃度は，HPLC-放射能検出により測定した。LCZ 関連放射能の組織分布は，定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）により測定した。

AHU 及び LBQ 由来の代謝物の同定及び定量は HPLC-放射能検出を用いて実施した。また，可能な場合はタンデム質量分析装置を接続した液体クロマトグラフィー（LC-MS/MS）によって代謝物を同定した。

4.2 吸収及び生物学的利用性

[^{14}C]LCZ 又は[^{14}C]AHU を経口投与したときの放射能濃度に基づく吸収率は，いずれの動物種においても良好であった（65%～100%）。いずれの動物種（マウス，ラット，イヌ，ウサギ，及びサル）においても吸収は比較的速やかで，総放射能濃度の Tmax は 0.25～2 時間の範囲であった [2.6.4-3.1 項]。血液中濃度又は血漿中濃度をそれぞれの用量により補正し，動物種間及び用量間で比較した（Table 4-1）。用量補正後の放射能，AHU 又は LBQ の曝露量（Cmax 及び AUC）はサルで高値を示した。LCZ 又は AHU を動物に経口投与したときの LBQ のバイオアベイラビリティは 41%～100%であった。

[^{14}C]AHU（マウス，ラット及びイヌ）又は[^{14}C]LCZ（サル）を単回経口投与後，血漿中総放射能濃度は消失半減期 1.3～26 時間で低下した。AHU の消失半減期は 1.3～3.2 時間，LBQ は 1.1～12 時間であり，VAL の消失半減期はサルで 6.5 時間であった。

Table 4-2に示したように，LBQ のクリアランス（CL）はマウスで 7.8 L/h/kg，ラットで 4.3 L/h/kg，イヌで 2.9 L/h/kg，及びサルで 0.21 L/h/kg であった。

AHU，LBQ 及び VAL の各曝露量は，いずれの動物種（マウス，ラット及びサル）においても，ほぼ用量に比例していた [2.6.4-3.2 項]。イヌに LCZ を投与したときの VAL の曝露量は，等価用量の VAL を AHU と併用投与したときの曝露量より約 3 倍高かった [Table 2.6.5.3C- R0600309]。

Table 4-1 [^{14}C]AHU 又は[^{14}C]LCZ を単回経口投与したときの用量補正後の血漿中又は血液中 Cmax 及び AUC

	動物種	用量 [mg/kg]	用量補正 Cmax[a]	用量補正 AUC[b]
総放射能	マウス	150 (AHU)	159	184
	ラット*	45 (AHU)	512	189
	イヌ*	15 (AHU)	379	1000
	サル	30 (LCZ)	1400	3220
AHU	マウス	150 (AHU)	17.1	8.61
	ラット*	45 (AHU)	1.17	2.18
	イヌ*	15 (AHU)	212	164
	サル	30 (LCZ)	184	247
LBQ	マウス	150 (AHU)	141	153
	ラット*	45 (AHU)	58.0	159
	イヌ*	15 (AHU)	198	263
	サル	30 (LCZ)	909	2030

放射能，AHU 及び LBQ のデータは， 2.6.4 薬物動態試験の概要文の Table 3-2～Table 3-4 から抜粋した。
a = (nM)/(μmol/kg)，b = (nM·h)/(μmol/kg)，*全血サンプルを用いた。

Table 4-2 LBQ の血漿又は血液クリアランス並びに定常状態における分布容積

動物種	静脈内投与 [mg/kg]（投与薬剤）	CL[a] (L/h/kg)	V_{ss} [a] (L/kg)	報告書番号
マウス	30 (LBQ)	7.8	1.3	R1200673
ラット	15 (AHU)	4.3 [b]	2.0 [b]	R0300247-1
イヌ	3 (LBQ)	2.9 [b]	2.5 [b]	R0301244
サル	10 (LBQ)	0.21	0.28	R1200729

a = 値は有効数字 2 桁で示す，b = 血液試料を測定した

Source：Table 2.6.5.3A- R1200673，Table 2.6.5.3A- R0300247-1，Table 2.6.5.3A- R0301244，Table 2.6.5.3A- R1200729

4.3 分布

In vitro 試験において，AHU，LBQ 及び VAL の血球移行はほとんど認められなかった [2.6.4-4.1 項]。AHU の血漿蛋白結合率はサルで 91%，LBQ の血漿蛋白結合率はラット，イヌ，及びサル血漿でそれぞれ 90%，80%，及び 93%であった。VAL の血清蛋白結合率は動物種間（ラット，イヌ及びマーモセット）で異なり，94%～98%の範囲であった。

[^{14}C] AHU をラットに単回静脈内又は経口投与したとき，放射能は多くの組織に広範かつ速やかに分布した [2.6.4-4.2 項]。静脈内投与 5 分後に腎臓，肝臓及び胆汁中で高い放射能（血液中濃度の 2～6 倍）が認められた。脳，眼，精嚢及び脊髄では放射能濃度が低かった。静脈内投与後，[^{14}C] AHU 由来の放射能の脳及び精巣での組織/血中濃度比はそれぞれ 0.02 及び 0.05 であった。

また，放射能のメラニン（有色皮膚及びブドウ膜）に対する親和性も低かった。経口投与後における放射能の組織内分布は，静脈内投与後と類似していた。多くの組織において，放射能濃度は経口投与後 1 時間で最高値に達し，腎臓及び肝臓で高い濃度が認められた。経口投与後 24 時間後の組織内放射能は，小腸及び腎臓を除いて定量下限を下回った。

[^{14}C]VAL を静脈内投与したとき，比較的高い放射能濃度が肝臓及び腎臓で認められた。[^{14}C]VAL 由来の放射能の脳及び精巣への移行は少なかった。経口投与後の組織分布は静脈内投与後と類似していた。いずれの投与経路においても，投与後 7 日目の残存放射能は，肝臓を除くすべての組織で定量下限未満であった。

4.4 胎児移行及び乳汁中移行

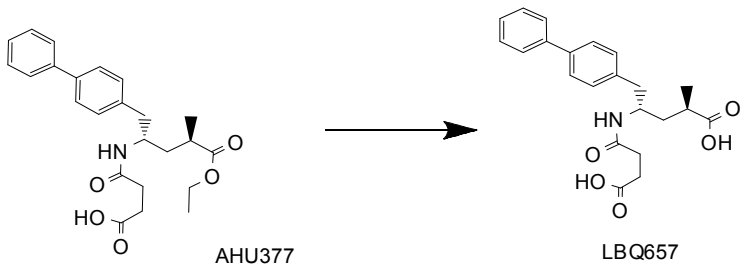
[^{14}C]LCZ を妊娠ラットに投与したとき，母動物の血液から胚・胎児組織への AHU 由来放射能の移行は少なかった（胎児の Tmax における胎児/母動物血液中濃度比は，妊娠 12 日で 0.51，妊娠 17 日で 0.25）[2.6.4-4.3 項]。LCZ を妊娠ウサギに投与したとき，母動物の血漿に対する胎児/母動物血漿中濃度の曝露量比は小さかった（LBQ については 0.06～0.21，VAL については約 0.01）ことから，LCZ 投与後の AHU，LBQ 及び VAL の胎児移行率は低いと考えられた （2.6.4-4.3 項）。

[^{14}C]LCZ（30 mg/kg）を授乳中のラットに経口投与後，LBQ の乳汁中移行が認められた [2.6.4-6 項]。総放射能の AUCinf に基づく乳汁中/血漿中曝露量比は 0.91 であった。[^{14}C]VAL を 3 mg/kg の用量で授乳中のラットに単回経口投与したとき，VAL の乳汁への移行が認められた。総放射能の乳汁中/血漿中曝露量比は，AUCinf に基づくと 0.23 であった（ディオバン錠，20 mg，40 mg，80 mg；製造承認申請資料添付資料ヘ-23）。

4.5 代謝

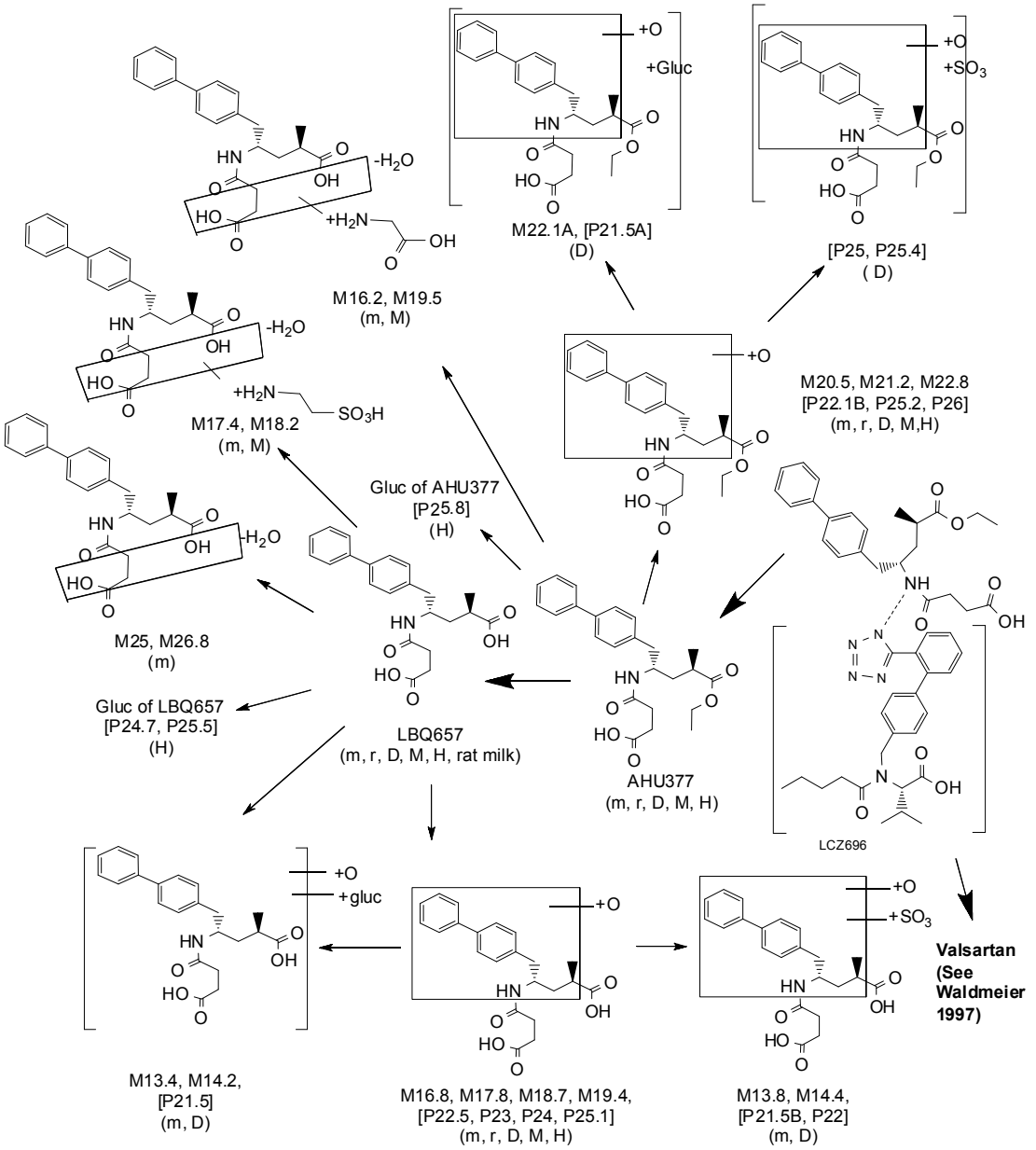
LCZ は経口投与後，AHU 及び VAL に解離し，吸収される。ラット，及びイヌの肝スライスにおいて，AHU は主にエステラーゼを介した加水分解を受け，LBQ が生成した[2.6.4-5.1 項]。肝スライスとのインキュベーションにより LBQ はほとんど代謝を受けなかった（Figure 4-1）。マウス，ラット，ウサギ，イヌ，及びマーモセット肝ミクロソームを用いて VAL の *in vitro* 代謝を検討した結果，酸化的代謝は緩徐かつ軽微であった（Nakashima et al. 2005）。

Figure 4-1 AHU の *in vitro* 代謝経路



[^{14}C]LCZ をサルに経口投与したとき，AHU，LBQ 及び VAL が血漿中に検出された [2.6.4-5.3 項]。 [^{14}C]AHU をマウス，ラット及びイヌに経口投与したとき，AHU 及び LBQ が血漿中に検出された。検討したすべての動物種において，AHU はエステル加水分解を受けて LBQ が主代謝物として生成した。マウス，及びラットにおける AHU から LBQ への代謝は速やかであり，血漿中で検出された主成分は LBQ であった（総放射能 AUCinf に対して，マウス（[^{14}C]AHU 投与）：83%，ラット（[^{14}C]AHU 投与）： 84%）。一方，イヌ及びサルにおいては，AHU 及び LBQ が血漿中に認められた（総放射能 AUCinf に対して，イヌ（[^{14}C]AHU 投与）では AHU 及び LBQ がそれぞれ 23%及び 36%，サル（[^{14}C]LCZ 投与）では AHU 及び LBQ が 7.7%及び 63%）。微量代謝物として AHU 及び LBQ の水酸化体，グルクロン酸抱合体，硫酸抱合体及びグリシン/タウリン抱合体が各動物種の血漿中に検出された。検討したすべての動物種において，LBQ は排泄物中から回収された主成分であり，経口投与量の約 70%以上を占めていた。AHU を経口投与後の排泄物中における未変化体の回収率は低く，投与量の 1%未満～14%であった。各動物種における推定代謝経路をFigure 4-2に示す。VAL の代謝については，既に報告されている（Waldmeier et al. 1997）。

Figure 4-2 AHU 及び LBQ の推定代謝経路



略号：m，r，D，M 及び H は，それぞれマウス，ラット，イヌ，サル及びヒトを示す。代謝物の識別番号として，[Table 2.6.5.3A-DMPK R0300247-1]，[Table 2.6.5.3A-DMPK R0301244]，CLCZ696B2105）に記載されている HPLC 保持時間（P），または [Table 2.6.5.3A-DMPK R1200673]，[Table 2.6.5.3A-DMPK R1200729] 及び [Table 2.6.5.13B-DMPK R1200622]に記載されている HPLC 保持時間（M）を付与した。

4.6 排泄

[^{14}C]AHU をマウス，ラット及びイヌに経口投与後，放射能は投与量の約 74%～98%が糞中に排泄され，尿中排泄は微量であった。[2.6.4-6 項]。一方，サルでは[^{14}C]LCZ 経口投与後，尿中に

も比較的多くの放射能（投与量の約 42%）が尿中に排泄された。血漿中濃度推移及び薬物動態パラメータから，明らかな腸肝循環はないと考えられた。マウス，ラット，イヌ，マーモセット及びヒトにおいて，VAL は主に胆汁を介して糞中に排泄された（Waldmeier et al. 1997）。

LCZ 又は AHU 投与後，AHU は主に LBQ として排泄され，AHU の未変化体の排泄は微量であった（投与量の約 3%，例外としてイヌでは約 13%）。また，動物及びヒトのいずれにおいても，排泄物中に数種類の微量代謝物が認められた。

4.7 薬物動態学的薬物相互作用

4.7.1 酵素阻害

ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験において，AHU はヒトチトクローム P450（CYP）の各分子種 CYP1A2，2C9，2D6，2E1，3A4/5 に対する阻害作用をほとんど示さず（IC_{50}：>100 µM），CYP2C8（IC_{50}：15 µM）及び 2C19（IC_{50}：20 µM）に対して弱い阻害作用を示したのみであった [2.6.4-7.1 項]。したがって，慢性心不全患者に LCZ 200 mg を 1 日 2 回反復経口投与後の AHU の Cmax,ss（2421 ng/mL: 約 5.5 µM）に基づくと，AHU と併用薬間で CYP を介した薬物間相互作用が生じる可能性は低いと考えられた（A2117 試験及び B223 試験）。LBQ は *in vitro* において CYP2C9 に対して弱い阻害作用（IC_{50}：40 µM）を示した。臨床試験において CYP2C9 阻害作用の影響を検討したところ，LCZ と CYP2C9 により代謝される薬物であるワルファリンの間での薬物間相互作用は認められなかった。LBQ は主として代謝を受けずに排泄されることから，その消失は CYP 阻害剤により影響されないと予測される。したがって，LBQ と併用薬の間で CYP を介した薬物間相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。VAL は CYP1A2, 2A6，2C19，2D6，2E1 及び 3A4/5 に対して有意な阻害作用を示さず，*in vitro* で CYP2C9 を比較的高い Ki 値（135 µM）でわずかに阻害した（Taavitsainen et al. 2000）。また，*in vivo* においてもワルファリンと LCZ との薬物相互作用試験において，VAL の薬物動態に相互作用は認められなかった。VAL から 4-ヒドロキシバレリル体への代謝に関与する酵素は CYP2C9 であるが，VAL は主に未変化体として尿及び糞中に排泄されたことから（Waldmeier et al. 1997），VAL と併用薬の間での CYP を介した薬物間相互作用は無視できると考えられた。

4.7.2 酵素誘導

初代培養ヒト肝細胞において，AHU，LBQ 及び VAL は，100 µM までの濃度で CYP1A2， 2B6, 2C9 及び 3A4/5 の発現及び酵素活性を誘導しなかった [2.6.4-7.2 項]。

4.7.3 トランスポーター

AHU の能動輸送に P-糖蛋白質（P-gp）の関与が *in vitro* 試験により示唆されたが [2.6.4-7.3 項], AHU と P-gp との親和性は低く（>100 µM），各動物種で高い吸収率（>65%）を示したことから，AHU の経口投与後の吸収時に P-gp による影響は大きくないと予測される。AHU は 50 µM までの

濃度で多剤耐性蛋白質 2（MRP2）及び P-gp を阻害せず，乳癌耐性蛋白質（BCRP）に対して弱い阻害作用を示した [2.6.4-7.4 項]。以上より，AHU が MRP2，P-gp 及び BCRP に対して有意な阻害作用を示す可能性は低いと考えられた。同様に，LBQ の P-gp 及び BCRP に対する阻害作用は認められなかったことから，P-gp 及び BCRP の基質となる薬剤と併用投与したとき薬物動態学的相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

In vitro 試験から，LBQ の肝臓への取り込みに有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1（OATP1B1）及び OATP1B3 による能動輸送の寄与が示唆された （2.6.4-7.3 項）。LBQ は *in vitro* で OATP1B1 阻害作用 （IC_{50}：126 µM）を示したが，OATP1B3 阻害作用は示さなかった（2.6.4-7.4 項） 。臨床試験で認められた LBQ の Cmax,ss（16531 ng/mL： 約 43 µM）に基づくと，LBQ が OATP1B1 阻害により併用薬の全身曝露量を増加させることはないと考えられた。

AHU，LBQ 及び VAL は，*in vitro* において有機カチオントランスポーター1（OCT1）及び OCT2 を阻害しなかった (2.6.4-7.4 項)。AHU は OATP1B1，OATP1B3 及び有機アニオントランスポーター3（OAT3）に対して阻害作用を示し，その IC_{50} 値はそれぞれ 1.9 µM，3.8 µM 及び 0.8 µM であった (2.6.4-7.4 項)。したがって，臨床試験で報告された AHU の Cmax,ss（約 5.5 µM）を考慮すると，AHU は OATP1B1/3 及び OAT3 の基質となる薬剤の全身曝露量を増加させる可能性がある。

LBQ は *in vitro* で OAT3 の基質であるとともに阻害作用（IC_{50}：15.2 µM）を示したが，OAT1 の阻害剤及び基質ではなかった。VAL は *in vitro* で OAT1 及び OAT3 の基質であった (2.6.4-7.3 項)。しかしながら， LBQ 及び VAL のヒトでの腎排泄の結果から，これらの *in vitro* での結果は臨床上大きく影響しないことが示されている(5.3.3.1-1-A1101 試験)。LCZ を投与後の投与量の約 55%が LBQ として尿中に排泄された。また，VAL の尿中排泄率は投与量の 11%程度であったことから LBQ による OAT3 を介した VAL の尿中排泄への影響は大きくないと考えられた。

ヒト肝細胞及び OATP1B1/MRP2 を発現させた MDCKII 細胞を用いた試験系において，VAL は OATP1B1，OATP1B3 及び MRP2 の *in vitro* 基質であることが報告されている（Yamashiro et al. 2006）。したがって，これらの取り込み又は排出型トランスポーターの阻害剤と併用投与したとき，VAL の全身曝露量に影響を及ぼす可能性が示唆される。

4.8 トキシコキネティクス

トキシコキネティクス試験における AHU，LBQ 及び VAL の濃度に関して，AUC はいずれの動物種（マウス，ラット，イヌ及びサル，妊娠ラット及びウサギを含む）においてもほぼ用量に比例していた [2.6.4-3.2 項]。ラット及びサルに 13 週間及び 39 週間反復経口投与したとき，明らかな蓄積性及び性差は認められなかった。

5 毒性試験

LCZ の毒性プロファイルは，LCZ，AHU，LBQ 及び VAL の毒性試験成績を用いて総合的に評価した。AT_1 受容体拮抗作用に関連した毒性が用量制限毒性となるため，AHU の活性体である LBQ の十分な曝露を確保するために，一部の毒性試験は AHU を用いて実施した。反復投与毒性試験，胚・胎児発生に関する試験及び遺伝毒性試験については，LCZ 及び AHU を用いて実施した。出生前及び出生後の発生に関する試験，幼若動物を用いた試験及びがん原性試験については，AHU の毒性試験のみで評価した。なお，VAL の毒性試験のうち，ディオバン錠の製造承認申請にて提出した試験成績については，本概要中への詳細な記載は省略した。

5.1 単回投与毒性試験

LCZ の単回投与毒性試験は実施しなかったが，概略の致死量を LCZ のラットを用いた安全性薬理試験及びサルを用いた短期反復投与毒性試験から推定した。ラットを用いた呼吸系及び中枢神経系に関する安全性薬理試験では，600 mg/kg までの用量で経口投与した結果，良好な忍容性がみられ，死亡は認められなかったことから，ラットにおける概略の致死量は 600 mg/kg 超と考えられた。サルを用いた 2 週間反復投与毒性試験では，600 mg/kg の用量で経口投与した結果，死亡は認められなかった。したがって，サルにおける概略の致死量は 600 mg/kg 超と考えられた。

AHU のマウス及びラットを用いた単回経口投与毒性試験では，いずれの動物種においても良好な忍容性が認められ，概略の致死量はいずれも 2000 mg/kg 超であった。腹腔内投与による単回投与毒性試験の結果，いずれの試験においても最高用量（500 mg/kg）まで死亡はみられず，概略の致死量は 500 mg/kg 超と考えられた（Table 5-1）。

Table 5-1 AHU の単回投与毒性試験

動物種/系統	投与経路	用量 (mg/kg)	概略の致死量 (mg/kg)	試験番号
マウス/ ICR	強制経口	50, 250, 1000, 2000	>2000	0480024
	腹腔内	25, 50, 300, 500	>500	0480022
ラット/ HanWistar	強制経口	50, 250, 1000, 2000	>2000	0480025
	腹腔内	25, 50, 300, 500	>500	0480023

Source: 2.6.7.5B-0480024，2.6.7.5B-0480022，2.6.7.5B-0480025，2.6.7.5B-0480023

5.2 反復投与毒性試験

LCZ の反復経口投与毒性試験として，ラットでは 26 週間まで，カニクイザルでは 39 週間までの投与期間で試験を実施した。カニクイザルの NEP 及びその基質にヒトとの相同性が認められていることから，非げっ歯類の動物種としてカニクイザルを選択した。

NEP 阻害作用を有する活性体である LBQ の十分な曝露量を得るために，AHU の反復投与毒性試験として，ラットでは 26 週間まで，マーモセットでは 52 週間までの投与期間で試験を実施した（Table 5-2）。

Table 5-2 LCZ の反復投与毒性試験

被験物質	動物種/系統	投与期間(週)	用量 (mg/kg/日)	試験番号
LCZ	ラット/ Wistar	2	0, 50, 200, 600, 1200	0670220
		2	0, 10, 30	0670468
		13	0, 10, 30, 100	0670283
		26	0, 10, 30, 100	0670620
	カニクイザル	1	25, 100	0670259
		2	0, 50, 100, 300, 600	0670276
		13	0, 30, 100, 300	0670282
		39	0, 30, 100, 300	0670621
AHU	ラット/ Wistar	1	0, 50, 250, 1000	0370107
		2	0, 10, 50, 150	0470084
		2	0, 250, 500, 1000, 2000	0670107
		13	0, 50, 100, 200, 400	0570207
		4/13	0, 400, 800, 1200	0770711
		26	0, 50, 150, 600	1370484
	マーモセット	1	0, 50, 250, 500	0370097
		52	0, 25, 100, 200	0570307

Source: 2.6.7.6A-0670220，2.6.7.6A-0670468，2.6.7.7B-0670283，2.6.7.7C-0670620，2.6.7.6A-0670259，2.6.7.6A-0670276，2.6.7.7D-0670282，2.6.7.7E-0670621，2.6.7.6B-0370107，2.6.7.6B-0470084，2.6.7.6B-0670107，2.6.7.7F-0570207，2.6.7.7G-0770711，2.6.7.7H-1370484，2.6.7.7I-0370097，2.6.7.7J-0570307

LCZ のラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（ラットでは 26 週間まで，サルでは 39 週間まで）において，ラットでは 100 mg/kg/日，サルでは 300 mg/kg/日まで良好な忍容性が認められ，いずれの動物種においても無毒性量は 30 mg/kg/日と考えられた。

AHU のラット及びマーモセットを用いた反復投与毒性試験（ラットでは 26 週間まで，マーモセットでは 52 週間まで）において，比較的高用量まで良好な忍容性がみられ，AHU 投与による新たな毒性標的器官は認められなかった。

標的器官毒性として，AT_1 受容体拮抗作用に関連した腎臓の変化（傍糸球体細胞の肥大／過形成）及びその二次的変化と考えられる赤血球系パラメータの低下，LCZ の降圧作用に関連したと考えられる心臓重量の低下，並びに AHU の局所刺激性に関連した胃腸管の変化が認められ，LCZ 又は AHU の毒性標的器官は，腎臓，赤血球系，心臓及び胃腸管と考えられた。

腎臓

LCZ 投与に関連した腎臓の変化（傍糸球体細胞の肥大／過形成）が，ラットでは 200 mg/kg/日以上，サルでは 100 mg/kg/日以上の用量で認められた。同様の変化は ACE 阻害薬及び ARB の毒性試験でも認められており，薬理作用である AT_1 受容体拮抗作用，輸出細動脈のレニン産生細胞の増加，又は腎血流量低下に対する糸球体濾過量維持のための適応反応に関連した変化と考えられている。LCZ の高用量群（600 mg/kg/日）のサルでは，傍糸球体細胞の肥大に加えて，血圧低

下に伴う腎潅流低下及び腎虚血に起因したと考えられる尿細管の変化（好塩基性尿細管，細胞質空胞化，単細胞壊死）が認められた。同様に，VAL のマーモセットを用いた 13 週間反復投与毒性試験の 200 mg/kg/日以上の群でも傍糸球体細胞及び尿細管の変化がみられたが，AHU のマウス，ラット及びマーモセットを用いた反復投与毒性試験では高用量群（マウス：1200 mg/kg/日の用量で 2 年間，ラット：600 mg/kg/日の用量で 26 週間及び 400 mg/kg/日の用量で 2 年間，マーモセット：200 mg/kg/日の用量で 52 週間）においても認められなかった。LCZ 投与によるレニン産生の増加は，低ナトリウム食飼料供与により RAAS を活性化させたイヌを用いた薬理試験でも確認されており，LCZ 又は VAL 投与群ではレニン産生の増加がみられたのに対し，AHU 投与群では認められなかった。LCZ 投与群におけるレニン増加量は，VAL 投与群に比較して約 30%の低値を示した。LCZ と VAL による腎臓の変化の重篤度に関しては，供試したサルの種類及び投与期間が異なるため比較することはできなかった。LCZ の腎臓に対する無毒性量は，ラットでは 100 mg/kg/日，サルでは 30 mg/kg/日（AUC 及び Cmax ともに VAL の曝露量比は 1 未満）と考えられた。

赤血球

血液学的検査では，LCZ 投与に関連した赤血球系パラメータの低下が，ラットでは 200 mg/kg/日以上の群，サルでは 300 mg/kg/日以上の群で認められた。AHU の反復投与毒性試験では，いずれの動物種においても赤血球系パラメータの変化は認められなかった。したがって，LCZ でみられた赤血球系パラメータの変化は，VAL の薬理作用に起因した腎臓におけるエリスロポエチン産生の抑制に関連したものと考えられた（Freudenthaler et al. 1999，Cole et al. 2000）。

心臓

心臓重量の低下が，LCZ のマウス（400 mg/kg/日以上）及びラット（100 mg/kg/日以上）を用いた試験，並びに AHU（400 mg/kg/日以上）のラットを用いた試験で認められ，血圧低下に関連した心拍出量及び心室収縮力の低下に伴う心負荷の低下により発現した変化と考えられた。いずれの試験においても，心臓の病理組織学的変化は認められなかった。なお，VAL のラットを用いた試験においても同様の変化が認められている。

胃腸管

LCZ のラットを用いた反復投与毒性試験では，50 mg/kg/日以上の群で可逆的な胃腸管の変化がみられ，病理組織学的変化として腺胃の限局性のびらん及び炎症が認められた。サルでは 30 mg/kg/日以上の群で嘔吐及び下痢がみられたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。胃炎は AHU の局所刺激性に起因した変化と考えられ，AHU の反復投与毒性試験において，ラットでは 50 mg/kg/日以上の群で，マーモセットでは 250 mg/kg/日以上の群で胃の病理組織学的変化が認められている。NEP はヒト正常胃粘膜の胃腺に瀰漫性に発現しており，胃潰瘍及び胃炎病変部では発現の低下が認められたことから，NEP 活性の低下に伴う基質濃度の上昇及び NEP

分解産物（substance P 断片等）の減少により胃炎進行の環境が形成される可能性が報告されている（Erin et al. 2012）。胃炎と局所刺激性との関連性について検討した LCZ のラットを用いた経口投与及び皮下投与による比較試験において，皮下投与群では投与部位の炎症性変化はみられたが胃炎は認められなかったのに対し，経口投与群では腺胃の炎症性細胞浸潤の増加が認められた。LCZ の皮下投与群における AHU，LBQ 及び VAL の曝露量は，経口投与群の曝露量より高値であったことから，LCZ 投与により発現した胃炎は AHU の刺激性に起因した変化と推察した（5.7 項）。さらに，AHU のマウスを用いた局所リンパ節測定法で軽度の刺激性がみられたこと，AHU のウサギを用いた眼一次刺激性試験で刺激性が認められたことも，AHU の刺激性を示唆する結果と考えられる。

一方，VAL の反復投与毒性試験でも高用量（ラット：600 mg/kg 以上，マーモセット：200 mg/kg 以上）で胃炎がみられ，マーモセットでは 40 mg/kg 以上の群で嘔吐が認められていることから，LCZ による胃炎には VAL が関与している可能性は否定できない。

LCZ による胃腸管の病理組織学的変化（腺胃のびらん，混合細胞浸潤）は，26 週間反復投与毒性試験（試験番号 0670620）の 100 mg/kg/日群でも認められたが，AHU の 13 週間反復投与毒性試験（試験番号 0570207 及び 0770711，用量 50～800 mg/kg/日），26 週間反復投与毒性試験（試験番号 1370484，用量 50～600 mg/kg/日）及び 104 週間がん原性試験（試験番号 0870373，用量 50～400 mg/kg/日）では胃炎は認められなかった。

胃炎に関しては，曝露量ではなく局所刺激性の関与が示唆されることから，曝露量比よりも用量比に基づいた安全性評価が適切と考えた。LCZ におけるラットの胃炎に対する無毒性量は 30 mg/kg/日であることから，予定最高臨床用量（200 mg を 1 日 2 回）と比較すると約 9 倍の用量比が確認された。

5.3 遺伝毒性試験

LCZ，AHU 及び LBQ の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験では，染色体構造異常誘発能及び染色体数的異常誘発能は認められなかった。

Table 5-3 LCZ，AHU 及び LBQ の遺伝毒性試験

被験物質	試験の種類	試験系	用量範囲	試験番号
LCZ	復帰突然変異	ネズミチフス菌 TA100, 102, 1535, 98, 97a	±S9: 8～5000 µg/plate	0612017
	染色体異常	ヒト末梢血リンパ球	-S9: 100～1300 µg/mL +S9: 1000～2000 µg/mL	0770050
	小核	Wistar 系ラット	0, 500，1000，2000 mg/kg	0770051
AHU	復帰突然変異	ネズミチフス菌 TA100, 102, 1535, 98, 97a	±S9: 8～5000 µg/plate	0412008
	染色体異常	ヒト末梢血リンパ球	-S9: 33～500 µg/mL +S9: 33～333 µg/mL	0420038
	小核	Wistar 系ラット	0, 125, 395, 1250 mg/kg	0412409
LBQ	染色体異常	ヒト末梢血リンパ球	-S9: 300～2400 µg/mL +S9: 1200～3400 µg/mL	1170562

Source: 2.6.7.8A-0612017，2.6.7.8B-0770050，2.6.7.9A-0770051，2.6.7.8C-0412008，2.6.7.8D-0420038，2.6.7.9B-0412409，2.6.7.8E-1170562

-S9: 代謝活性化非存在下；+S9: 代謝活性化存在下

5.4 がん原性試験

LCZ を投与したマウス及びラットにおける AHU 及び LBQ の曝露量は予想臨床用量を投与したヒトにおける曝露量を下回り，がん原性試験で要求される曝露量が得られないと予測される。したがって，LCZ のがん原性については AHU 及び VAL のがん原性試験の成績から評価した。

AHU のマウス及びラットを用いた 104 週間がん原性試験では，いずれの試験においてもがん原性を示唆する変化は認められなかった。高用量群における LBQ の曝露量と予定最高臨床用量（200 mg を 1 日 2 回）における LBQ の曝露量を比較すると，マウスでは AUC0-24h で 1.7～2.5 倍，Cmax で 14～16 倍，ラットでは AUC0-24h で 0.71～0.88 倍，Cmax で 3.3～4.5 倍であった。ラットとヒトの蛋白結合率に差があることから，非結合型曝露量の比較ではさらに 3 倍の曝露比があるものと考えられる。また，VAL のマウス及びラットを用いたがん原性試験では，VAL 投与に関連した腫瘍発現頻度の増加は認められなかった。これらの試験結果から，LCZ のがん原性リスクは低いものと考えられた [2.6.6-5 項]。

Table 5-4 AHU のがん原性試験

動物種/系統	動物数/群	投与経路	投与期間	用量 (mg/kg)	試験番号
マウス/ICR	雄: 70 雌: 70	強制経口	104 週間	0, 150, 400, 1200	0870374
ラット/Wistar	雄: 50 雌: 50	強制経口	104 週間	0, 50, 150, 400	0870373

Source: 2.6.7.10D-0870374，2.6.7.10E-0870373

また，NEP 阻害による理論上のリスクとして腫瘍進行が考えられることから，種々の癌種における NEP コード遺伝子（membrane metallo-endopeptidase，MME）の変異と腫瘍進行との関連性を *in silico* 解析により評価した結果，NEP 阻害による腫瘍進行リスクは低いものと考えられた[2.6.6-5.4 項]。

5.5 生殖発生毒性試験

LCZ の生殖発生毒性試験として，ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，並びにラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験を実施した。LCZ 投与における AHU 及び LBQ の曝露量は VAL の用量制限毒性により制限されることから，十分な曝露量を得るために，AHU のラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験，並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験を実施し，先に実施した VAL の生殖発生毒性試験の成績と合わせて，LCZ の生殖発生毒性について評価した。

5.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

各試験の最高用量においても，ラットの受胎能及び初期胚発生に対する LCZ，AHU 及び VAL に関連した影響は認められなかった。

Table 5-5 LCZ 及び AHU の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

被験物質	動物種/系統	投与経路	用量 (mg/kg/日)	投与期間	試験番号
LCZ	ラット/ Wistar	強制経口	0, 10, 50, 150	雄：交配前 4 週間 雌：交配前 2 週間及び妊娠 6 日まで	0970613
AHU	ラット/ Wistar	強制経口	0, 75, 250, 750	雄：交配前 4 週間 雌：交配前 2 週間及び妊娠 6 日まで	1370483

Source: Table 2.6.7.12A-0970613，Table 2.6.7.12B-1370483

5.5.2 胚・胎児発生に関する試験

LCZ のラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，ラット及びウサギで胚・胎児致死作用を含む胚・胎児毒性がみられ，ウサギでは 10 mg/kg/日以上の群で水頭症が認められた。VAL のウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，母動物毒性発現用量である 5 mg/kg/日以上の群で胎児の低体重に関連して側脳室拡張の発現頻度の増加がみられていることから，VAL 投与に関連した変化である可能性が考えられた。AHU 及び VAL のウサギを用いた試験では，胚・胎児致死作用を含む胎児毒性が認められた。LCZ の胚・胎児発生に関する試験の無毒性量は，ラットでは 30 mg/kg/日，ウサギでは 3 mg/kg/日と考えられた。AHU の試験における無毒性量は，ラットでは 750 mg/kg/日，ウサギでは 200 mg/kg/日と考えられた。

Table 5-6 LCZ 及び AHU の胚・胎児発生に関する試験

被験物質	動物種/系統	投与経路	用量 (mg/kg/日)	投与期間	試験番号
LCZ	ラット/ Wistar	強制経口	0, 30, 100, 200	妊娠 6～17 日	0670390
	ウサギ/ NZW	強制経口	0, 3, 10, 30	妊娠 7～20 日	0670280
AHU	ラット/ Wistar	強制経口	0, 75, 250, 750	妊娠 6～17 日	0570301
	ウサギ/ NZW	強制経口	0, 15, 50, 200, 500	妊娠 7～20 日	0770644

Source：Table 2.6.7.13A-0670390, Table 2.6.7.13B-0670280, Table 2.6.7.13C-0570301, Table 2.6.7.13D-0770644

5.5.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

LCZ の出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験は実施しなかった。LCZ 投与による AHU 及び LBQ の曝露量は VAL の用量制限毒性により制限されることから，十分な曝露量を得るために，AHU のラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験を実施した。AHU 投与に関連した出生児及び離乳児に対する影響として，750 mg/kg/日群で可逆的なごく軽度の体重低下がみられたが，F1 児の発生，行動・発達及び生殖能に異常は認められなかった。本試験における無毒性量は，母動物では 750 mg/kg/日，出生児では 250 mg/kg/日と考えられた。

Table 5-7 AHU の出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

動物種/系統	投与経路	用量 (mg/kg/日)	投与期間	試験番号
ラット/ Wistar	強制経口	0, 50, 250, 750	妊娠 7 日から分娩後 22 日	1070349

Source：Table 2.6.7.14A-1070349

5.5.4 幼若動物を用いた試験

LCZ の幼若動物を用いた毒性試験は，VAL の用量制限毒性により，AHU 及び LBQ の毒性評価が不十分となる可能性が考えられたため実施しなかった。AHU 及び VAL の幼若動物を用いた毒性試験を実施し，新生児及び幼若動物における毒性を評価した（Table 5-8）。

AHU の幼若ラットを用いた試験では，400 mg/kg/日以上の群で体重増加の軽度の抑制，骨量（骨密度及び骨塩量）の減少が，800 mg/kg/日群でごく軽度の骨長（大腿骨及び脛骨）の減少がみられたが，幼若ウサギを用いた試験では同様の変化は認められなかった。幼若ラットにおける骨の変化は一過性で可逆性の変化であることから，成長板閉鎖までには成長遅延を補うための十分な期間があると考えられる。これらの変化の発現機序の詳細は不明であるが，AHU/LBQ が高曝露となる期間であり体重増加の抑制が認められていることから，体重増加の抑制（身体的発達）に関連した変化である可能性が考えられた。

VAL の幼若動物を用いた試験では，すべての VAL 投与群（1，20 及び 150 mg/kg/日）で腎尿細管及び腎盂の変化が認められた。幼若ラットでみられた腎臓の変化は，ACE 阻害薬及び ARB で期待される薬理作用の過剰発現によるものであり，ラットの腎臓形成期である生後 13 日までの投与により発現することが知られている。ヒトでは出生前に腎臓形成がほぼ完了していることから，腎臓への影響は 1 歳未満の小児における懸念事項と考えられる。

AHU 及び VAL の幼若ラットを用いた毒性試験の結果から，幼若動物における LCZ の毒性標的器官は腎臓及び骨と考えられた。

Table 5-8 幼若動物を用いた毒性試験

被験物質	動物種/系統	投与経路	用量 (mg/kg/日)	投与期間	試験番号
AHU	ラット/Wistar	強制経口	0, 100, 400, 800	出生後 7～70 日	0870734
	ラット/Wistar	強制経口	0, 100, 400, 800	出生後 7～35 日	1170516
	ウサギ/NZW	強制経口	0, 5, 50, 150	出生後 28～56 日	1170514
VAL	ラット/Wistar	強制経口	0, 1, 20, 150	出生後 7～70 日	0680270

Source: Table 2.6.7.15B-0870734, Table 2.6.7.15C-1170516, Table 2.6.7.15D-1170514, Table 2.6.7.15E-0680270

5.5.5 生殖発生毒性試験の総合評価

生殖発生毒性試験の結果から，妊娠中のヒトへの LCZ 投与による胎児毒性発現リスクが示唆された。妊娠第 2 及び第 3 三半期における RAAS 阻害薬の使用により，胎児の腎機能低下，並びに胎児及び新生児の罹病率及び死亡の増加が報告されている。RAAS 阻害薬の使用により生じる羊水過少症により，胎児の肺の形成不全，骨格異常，頭蓋骨形成不全，無尿症及び低血圧が発現する可能性が考えられる（Serreau et al. 2004，Darby et al 2013）。したがって，RAAS を阻害する他の薬剤と同様に，妊娠中の本剤の使用は禁忌とすることが推奨される。妊娠の可能性のある女性では，妊娠していないことが明らかであり，有効な避妊法を使用している場合に限り本剤を使用できることとする。一方，LCZ 及びその代謝物の精液中への移行量は極めて低く，精液を介し

た母体における曝露量は，ラット及びウサギの胚・胎児死亡及び催奇形性に関する無毒性量における曝露量の 500 分の 1 程度と予測されることから，男性患者の避妊は必要ないと判断した。

5.6 曝露量の比較

LCZ の予定最高臨床用量（200 mg を 1 日 2 回）を投与した心不全患者における曝露量をTable 5-9に示す。LCZ のラット，ウサギ及びサルを用いた毒性試験の曝露量とヒトの曝露量との比較をTable 5-10に，AHU のマウス，ラット，ウサギ及びマーモセットを用いた毒性試験の曝露量とヒトの曝露量との比較をTable 5-11に示す。LCZ のラット及びサルを用いた毒性試験の無毒性量における AHU，LBQ 及び VAL の曝露量は，予定最高臨床用量におけるヒト曝露量に比較して概ね低値であったが，サルを用いた反復投与毒性試験の最大耐量における LBQ 及び VAL の曝露量は比較的高値を示した。曝露量比の低値は，蛋白結合，LBQ への変換，分布容積及び消失における動物種差を反映したものと考えられた。LCZ 投与に関連した毒性徴候は，主に ARB の薬理作用の過剰発現及びその二次的変化であり，げっ歯類における用量制限毒性である胃炎はヒトの消化管関連の副作用には関連しない変化と考えられた。非臨床毒性試験の無毒性量における曝露量は予定最高臨床用量における曝露量に比較して低値を示したが，心不全患者を対象とした臨床試験では予定最高臨床用量においても良好な忍容性が認められた。

Table 5-9 LCZ 200 mg を 1 日 2 回投与した心不全患者における曝露量の要約

AHU		LBQ		VAL	
AUC0-12h	Cmax	AUC0-12h	Cmax	AUC0-12h	Cmax
3253	2421	151611	16531	41388	6154

Souce: A2117 試験，B2223 試験

単位：AUC0-12h = ng•hr/mL，Cmax = ng/mL

測定値は 43 例の患者の平均値を示す

Table 5-10 LCZ の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比

動物種/試験の種類 [試験番号]	用量 (mg/kg)	性	AHU				LBQ				VAL			
			AUC [a]	Cmax [a]	曝露量比 [b]		AUC [a]	Cmax [a]	曝露量比 [b]		AUC [a]	Cmax [a]	曝露量比 [b]	
					AUC 比	Cmax 比			AUC 比	Cmax 比			AUC 比	Cmax 比
ラット/26 週間 [0670620]	30 無毒性量	雄	15.3	12.6	0.002	0.005	3620	1600	0.01	0.10	8650	1240	0.10	0.20
		雌	74.4	61.7	NA	0.03	6720	4140	0.02	0.25	7560	3080	0.09	0.50
	100 最大耐量	雄	253	87.2	0.04	0.04	14700	4930	0.05	0.30	28400	4660	0.34	0.76
		雌	239	206	0.04	0.09	15700	10600	0.05	0.64	25900	5060	0.31	0.82
サル/ 39 週間 [0670621]	30 無毒性量	雄	2640	1270	0.41	0.52	30300	8680	0.10	0.53	9990	813	0.12	0.13
		雌	2000	1020	0.31	0.42	24100	6680	0.08	0.40	7010	825	0.09	0.13
	300 最大耐量	雄	93400	36900	14	15	659000	141000	2.2	8.5	69800	9330	0.84	1.5
		雌	111000	38300	17	16	569000	146000	1.9	8.8	65200	10600	0.79	1.7
ラット/ FEED [0970613] [c]	150 無毒性量	雄	518	329	0.08	0.14	54450	19200	0.18	1.2	80250	12990	0.97	2.1
		雌	437	189	0.07	0.08	28950	8610	0.10	0.52	48900	8640	0.59	1.4
ラット/ EFD [0670390]	30 無毒性量	雌	NA	NA	NA	NA	5950	1970	0.02	0.12	13400	3020	0.16	0.49
ウサギ/ EFD [0670280]	3 無毒性量	雌	52.9	15.0	0.008	0.006	1930	491	0.006	0.03	41100	2850	0.50	0.46

Source: 2.6.7.7 C-0670620, 2.6.7.7 E-0670621, 2.6.7.12 A-0970613, 2.6.7.13 A-0670390, 2.6.7.13 B-0670280

単位： AUC0-24h = ng•hr/mL, Cmax = ng/mL

NA = Not available. AHU の血中濃度が検出限界未満のためトキシコキネティクスパラメータは算出しなかった；FEED = 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験；EFD = 胚・胎児発生に関する試験

a = 投与期間終了時の測定値

b = 200 mg を 1 日 2 回投与したヒト曝露量（A2117 試験及び B2223 試験，Table 5-9）を基に算出

c = ラット 13 週間（試験 0670283）の 100 mg/kg 群の測定値から算出した

Table 5-11 AHU の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比

動物種/ 試験の種類 [試験番号]	用量 (mg/kg)	性	AHU				LBQ			
			AUC [a]	Cmax [a]	曝露量比 [b]		AUC [a]	Cmax [a]	曝露量比 [b]	
					AUC 比	Cmax 比			AUC 比	Cmax 比
ラット/ 2 週間	150	雄	1310	383	0.20	0.16	82500	22700	0.27	1.4
[0470084]	無毒性量	雌	2360	497	0.36	0.21	81300	10300	0.27	0.62
ラット/ 26 週間	600	雄	11800	7070	1.8	2.9	341000	48000	1.1	2.9
[1370484]	無毒性量	雌	7480	2940	1.2	1.2	347000	131000	1.1	7.9
マーモセット/ 52 週間	25	雄	75200	40700	12	17	34200	17100	0.11	1.0
[0570307]	無毒性量	雌	36000	9990	5.5	4.1	26600	8440	0.09	0.51
	200	雄	556000	236000	85	97	401000	122000	1.3	7.4
	最大耐量	雌	694000	269000	107	111	482000	137000	1.6	8.3
マウス/ がん原性	1200	雄	55000	17200	8.5	7.1	759000	230000	2.5	14
[0870374] [c]	無毒性量	雌	33800	17900	5.2	7.4	510000	268000	1.7	16
ラット/ がん原性	400	雄	9710	2370	1.5	0.98	266000	53900	0.88	3.3
[0870373] [d]	無毒性量	雌	5610	1850	0.86	0.76	214000	74500	0.71	4.5

動物種/ 試験の種類 [試験番号]	用量 (mg/kg)	性	AHU				LBQ			
			AUC [a]	Cmax [a]	曝露量比 [b]		AUC [a]	Cmax [a]	曝露量比 [b]	
					AUC 比	Cmax 比			AUC 比	Cmax 比
ラット/ FEED [1370483] [e]	750 無毒性量	雄	11200	2350	1.7	0.97	249000	50500	0.82	3.1
		雌	23000	3100	3.5	1.3	201000	69800	0.66	4.2
ラット/ EFD [0570301] [f]	750 最大耐量	雌	38000	24600	5.8	10	659000	67000	2.2	4.1
ウサギ/ EFD [0770644] [f]	200 最大耐量	雌	16400	2030	2.5	0.84	679000	68200	2.2	4.1
ラット/ PPND [1070349] [g]	250	雄	1460	585	0.22	0.24	70600	33800	0.23	2.0
		雌	2500	938	0.38	0.39	104000	21800	0.34	1.3

Source: 2.6.7.6 B-0470084, 2.6.7.7 H-1370484, 2.6.7.7 J-0570307, 2.6.7.10 D-0870374, 2.6.7.10 E-0870373, 2.6.7.12 B-1370483, 2.6.7.13 C-0570301, 2.6.7.13 D-0770644, 2.6.7.14 A-1070349

単位： AUC0-24h = ng•hr/mL, Cmax = ng/mL

FEED = 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験；EFD = 胚・胎児発生に関する試験；PPND = 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

a = 投与期間終了時の測定値

b = 200 mg を 1 日 2 回投与したヒト曝露量（A2117 試験及び B2223 試験, Table 5-9）を基に算出

c = 0770896 試験の 1200 mg/kg 群（ 試験 72 日）の測定値から算出

d = 0770711 試験の 400 mg/kg 群（ 試験 72 日）の測定値から算出

e = 0770711 試験の 800 mg/kg 群（ 試験 72 日）の測定値から算出

f = 胚・胎児発生に関する無毒性量

g = 0770711 試験の 400 mg/kg 群（ 試験 27 日）の測定値から算出

5.7 局所刺激性試験

LCZ の局所忍容性については，LCZ のラットを用いた皮下投与試験 [2.6.6-7.1.1 項]，及び経口投与と皮下投与との比較試験 [2.6.6-7.1.2 項] により評価した。皮下投与又は強制経口投与により LCZ を 200 mg/kg/日の用量で 5 日間反復投与し，毒性及び曝露量を比較した。皮下投与群では LCZ 投与に関連した注射部位の変化がみられ，病理組織学的変化として注射部位局所の炎症がみられたが，胃炎は認められなかった。経口投与群における AHU，LBQ 及び VAL の曝露量は皮下投与群よりも低値であったが，胃炎が認められた。これらの結果から，LCZ の反復投与毒性試験でみられた胃の病理組織学的変化は，局所刺激性によるものと考えられた。

AHU のマウスを用いた局所リンパ節試験では，AHU は軽度の刺激性を有する軽度感作性物質であることが示唆された。AHU のウサギを用いた皮膚一次刺激性試験では局所刺激性はみられなかったが，眼一次刺激性試験では AHU の刺激性が認められた。

5.8 その他の毒性試験

5.8.1 免疫毒性試験

LCZ 又は AHU の反復投与毒性試験若しくはがん原性試験では，リンパ系組織の変化，感染症の増加，リンパ増殖性変化は認められなかったことから，LCZ が免疫系器官に影響を及ぼす可能性は低いものと判断し，LCZ の免疫毒性試験は実施しなかった。

5.8.2 光毒性試験

AHU，LBQ 及び VAL に，290～700 nm の範囲の波長に特異的な光吸収波長は認められなかった。さらに，LCZ の分布試験では，メラニン含有組織（ブドウ膜，皮膚）における特別な滞留は認められなかった。したがって，日光により光化学的に活性化する可能性は低いと考えられることから，光毒性試験は実施しなかった。

5.8.3 NEP 基質への影響に関する探索的試験

NEP の基質に対する LCZ の阻害作用に関連した理論上のリスクについて検討するため，アミロイドβ（amyloid β，Aβ）代謝及び骨に対する影響に関する探索的試験を実施した。

5.8.3.1 LCZ の Aβ 代謝に対する影響に関する探索的試験

カニクイザルを用いた SILK-Aβ assay（the amyloid beta stable isotope labeling kinetic assay）による探索的試験を実施し，LCZ の Aβ 代謝に対する影響について検討した。LCZ を 50 mg/kg/日の用量（400 mg を投与したヒトの血漿及び CSF 中 LBQ 濃度に相当する）で 2 週間反復経口投与し，脳脊髄液（cerebral spinal fluid，CSF）中，血漿中及び脳中 Aβ（Aβ37，Aβ38，Aβ40，Aβ42）濃度を測定した。

試験 1 日に CSF 中 Aβ（38，40，42）の消失半減期の延長及び CSF 中新規産生 Aβ42 の有意な増加がみられ，試験 15 及び 16 日には CSF 中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の増加，並びに血漿中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の増加が認められた。試験 15 日の検査では CSF 中 Aβ の消失半減期に対照群との差はみられず，試験 16 日の検査では脳中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の増加も認められなかった。これらの結果は，ヒト NEP 阻害活性の IC_{50} 値を上回る CSF 中 LBQ により，タンパク質分解による Aβ クリアランスが低下したためと考えられた。一方，試験 15 日の Aβ 消失半減期に差がみられなかったこと，並びに試験 16 日の脳中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の増加が認められなかったことは，CSF から血漿中に移行する Aβ の消失経路が維持されていることを示唆するものと考えられた。

また，カニクイザルを用いた 39 週間反復投与毒性試験では，LCZ を 300 mg/kg/日までの用量で 39 週間反復経口投与した結果，脳の病理組織学的変化はみられず，免疫組織化学的検査では，脳及び脳血管における Aβ42 染色領域の増加又はアミロイド斑形成は認められなかった。300 mg/kg/日群の曝露量は，予定最高臨床用量（200 mg を 1 日 2 回）におけるヒト LBQ 曝露量と比較すると AUC で 1.9～2.2 倍，Cmax で 8.5～8.8 倍であった。

5.8.3.2 AHU の骨に対する影響に関する探索的試験

NEP の基質である CNP は骨形成に関与しているとの報告があることから，AHU の骨への影響の検討を目的として，ラット骨肉腫細胞株（UMR-106 細胞）を用いた *in vitro* 試験及び成熟雌ラット（19 週齢）を用いた 13 週間反復投与探索的試験を実施した。*In vitro* 試験の結果，AHU 及び LBQ の UMR-106 細胞の石灰化に及ぼす影響は認められなかった。また，成熟雌ラットを用いた探索的試験では，AHU 投与に関連した骨吸収の増加はみられなかったが，成熟ラットにおける持続的な骨形成を示唆するオステオカルシンの減少傾向を伴う骨塩量の軽微な低下が認められた。これらの変化は軽微であり，骨吸収の増加又は骨の病理組織学的変化はみられず，ラット及びサルを用いた 26 週間又は 39 週間反復投与毒性試験では骨の病理組織学的変化は認められなかった。

6 不純物及び分解物

不純物に関する ICH ガイドライン「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン（ICH Q3A）」及び「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン（ICH Q3B）」に従うと，安全性の評価が必要な閾値を上回る不純物として，類縁物質A*（原薬の規格：[redacted]%以下）及び 類縁物質B*（原薬の規格：[redacted]%以下）が該当する。しかしながら，類縁物質A*は[redacted]であることから，安全性は確認されているものと判断した。また，[redacted]類縁物質B*の安全性については[redacted]の初回承認申請時に既に評価されており（[redacted]；製造承認申請資料添付資料ニ-26，27），[redacted]に規定される[redacted]の限度値は[redacted]%以下であることから，規格値までの安全性は既に確認されているものと判断した。なお，その他の

＊承認情報提供時に置き換えた

不純物（類縁物質C*，類縁物質D* 及び 類縁物質E*）の原薬の規格はいずれも[redacted]%以下に設定されており，安全性の確認が必要な閾値以下である。

7 安全性の総合評価

LCZ の非臨床安全性プロファイルは，LCZ，AHU，LBQ 及び VAL の毒性試験及び安全性薬理試験の成績を用いて総合的に評価した。LCZ の AT_1 受容体拮抗作用に関連した毒性が用量制限毒性となることから，AHU の活性体である LBQ の十分な曝露を確保するために，一部の毒性試験は AHU を用いて実施した。安全性薬理試験では LCZ，AHU 及び LBQ を使用し，心血管系，呼吸系及び中枢神経系に対する影響について評価した。

LCZ，AHU 及び LBQ の安全性薬理試験では，LCZ，AHU 及び LBQ 投与に関連した心血管系，中枢神経系及び呼吸系における有害な変化は認められなかった。

LCZ のラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（ラットでは 26 週間まで，サルでは 39 週間までの投与期間）における無毒性量は，いずれの動物種においても 30 mg/kg/日と考えられた。標的器官毒性として，AT_1 受容体拮抗作用に関連した腎臓の変化（傍糸球体細胞の肥大／過形成）及びその二次的変化と考えられる赤血球系パラメータの低下，LCZ の降圧作用に関連したと考えられる心臓重量の低下，並びに AHU の局所刺激性に関連した胃腸管の変化が認められた。

LCZ，AHU 及び VAL の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験（Ames 試験，染色体異常試験，ラットを用いた小核試験），並びに LBQ の *in vitro* 染色体異常試験の結果，いずれの試験においても遺伝毒性を示唆する変化は認められなかった。AHU のマウス及びラットを用いた経口投与による 104 週間がん原性試験，並びに VAL のマウス及びラットを用いた混餌投与による 104 週間がん原性試験では，がん原性を示唆する変化は認められなかった。

LCZ のラット及びウサギを用いた胚・胎児に関する試験では，ラット及びウサギで胚・胎児死亡を含む胚・胎児毒性が確認され，ウサギで催奇形性が認められた。胚毒性及び胎児死亡は，AHU 及び VAL の生殖発生毒性試験でも認められている。VAL のラットを用いた周産期及び授乳期投与試験の高用量群では，出生児において出生後の発生・発達の遅延，体重増加の抑制及び生存率の低下が認められた。AHU のラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験の高用量群では，可逆的な体重の軽度の低下が認められた。生殖発生毒性試験の結果，妊娠中のヒトへの LCZ の投与により，胎児に悪影響を及ぼす可能性が示唆されたことから，妊婦または妊娠している可能性のある女性は LCZ を使用すべきではない。また，ラットで LCZ の乳汁移行が示唆され，授乳中の新生児に AHU 及び VAL 投与に関連した変化が認められていることから，授乳中の女性は LCZ 投与中は授乳しないことが望ましい。

AHU 又は VAL の幼若動物を用いた試験の結果から，LCZ の幼若動物における毒性標的器官として腎臓及び骨が考えられた。VAL の幼若ラットを用いた毒性試験では，すべての用量で腎尿細管及び腎盂の変化が認められたため無毒性量を設定することはできなかった。新生児における腎臓の変化は，ACE 阻害薬及び AT_1 受容体拮抗薬で予想される薬理作用の過剰発現によるもので

あり，ラットの腎形成期間である生後 13 日までにこれらの薬剤を投与した場合に認められる。ヒトでは出生時までに腎形成がほぼ完了しているため，1 歳未満の乳児において懸念される事項である。AHU の幼若ラットを用いた毒性試験では，体重，骨長及び骨密度の低下が認められた。幼若ウサギ及び成熟ラットでは骨への影響は認められなかった。幼若ラットで認められた骨への影響は，NEP 阻害作用から予想される CNP の変化に関連したものとは逆の変化であることから，AHU 又は LBQ の高曝露による体重増加の抑制の二次的変化と考えられた。

LCZ の NEP 阻害作用に関連した理論上のリスクとして，NEP の基質である BK，Aβ 及び CNP の上昇により，それぞれ血管浮腫，Aβ クリアランスの低下及び脳内蓄積，並びに骨の成長促進及び異常骨形成が発現する可能性が考えられるが，非臨床試験では，Aβ 代謝への影響を除いて，関連する変化は認められなかった。また，NP 増加に伴う NPR-A 活性上昇に関連した理論上のリスクとして，脂肪分解の促進（Birkenfeld et al. 2011，Lafontan et al. 2008）及び NEP 欠損マウス（Becker et al. 2010）でみられた遅発性肥満の発症が考えられる。このリスクについての検討を目的とした非臨床試験は実施していない。しかしながら，LCZ 及び AHU のラット及びサルを用いた反復投与毒性試験あるいは AHU のげっ歯類を用いた 2 年間がん原性試験において，インスリン抵抗性の増加（空腹時血糖値の上昇）若しくは脂質動員（コレステロール又はトリグリセライドの増加），並びに脂肪分解の促進あるいは遅発性肥満の発症を示唆する変化は認められなかった。

Aβ 代謝への影響について検討するために実施したサルを用いた 2 週間反復経口投与による探索的試験において，LCZ 投与群では CSF 中 Aβ の消失半減期の延長及び新規産生 Aβ の増加，並びに CSF 中及び血漿中 Aβ 濃度の増加が認められた。これらの結果は，LBQ の NEP 阻害作用によって Aβ の分解酵素によるクリアランスが低下したためと考えられた。試験 16 日の脳中 Aβ 濃度の増加はみられず，試験 15 日の CSF 中 Aβ 消失半減期に差が認められなかったことから，脳中 Aβ は分解酵素以外の消失経路により脳内から消失したものと推察され，CSF 中及び血漿中 Aβ 濃度の増加もこの考察を支持すると考えられた。2 週間反復投与による探索的試験で脳中 Aβ の増加がみられなかったことに一致して，39 週間反復投与毒性試験において LCZ 投与に関連した脳の病理組織学的変化がみられず，抗 Aβ42 抗体を用いた免疫組織化学検査で異常が認められなかった。健康成人を対象とした Aβ に対する LCZ の影響を検討した臨床試験（A2126 試験）では，LCZ を 400 mg の用量で 1 日 1 回 2 週間経口投与した結果，CSF 中 Aβ-40 濃度の変動が認められなかったことから，Aβ-40 の消失に対する NEP 阻害の関与は限定的であり，Aβ 消失の代替経路が機能している可能性が示唆された。Aβ 分解に関与する他のメタロプロテアーゼ（中枢移行性 ACE 阻害薬であるラミプリル，ACE 及び NEP 阻害薬であるオマパトリラト）の臨床試験の結果は，ACE 及び NEP 阻害による CSF 中 Aβ 濃度への影響及び認知症発症の可能性は低いことを示している（Packer et al. 2002，Wharton et al. 2012）。74064 名のアルツハイマー病に関するゲノムワイド関連解析（GWAS）では，NEP を含む Aβ 代謝酵素の関連遺伝子はアルツハイマー病のリスク遺伝子として確認されず，さらに，遺伝子変異による NEP 欠損家系においても認知機能障

害の早期発症は認められなかったことが報告されている（Debiec et al. 2004，Lambert et al. 2013）。以上より，LCZ の長期投与によりヒトの認知機能に影響を及ぼす可能性は低いものと考えられる。

LCZ のラット及びサルを用いた毒性試験の無毒性量における AHU，LBQ 及び VAL の曝露量は，予定最高臨床用量におけるヒト曝露量に比較して概ね低値を示したが，サルを用いた試験の最大耐量における LBQ 及び VAL の曝露量は比較的高値であった。AHU の反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験では，LCZ の試験と比較すると高い曝露量比が得られた。

以上のとおり，LCZ の毒性試験でみられた主な毒性変化は，本薬の薬理作用又は局所刺激性に関連した変化であり，慢性心不全の治療を目的とした患者への投与を妨げるものではないと考えられた。

8 結論

一連の薬理学的検討により，LCZ は ARNI として，NP の作用を亢進させるだけでなく，RAAS を抑制することにより，これらの単一の作用に比べてより優れた心血管系及び腎臓に対する保護作用を持つことが示された。また，安定した降圧作用も示されたほか，副次的薬理試験及び安全性薬理試験では問題となる作用はみられなかった。

以上のことから，LCZ は既存の慢性心不全治療薬を上回る効果が期待され，安全性及び有効性の高い慢性心不全治療薬となることが期待される。

9 参考文献

[Becker M, Siems WE, Kluge R et al. (2010)] New function for an old enzyme: NEP deficient mice develop late onset obesity. PLOS ONE; 5(9):e12793.

[Birkenfeld AL, Adams F, Schroeder C, et al. (2011)] Metabolic action could confound advantageous effects of combined angiotensin II receptor and neprilysin inhibition. Hypertension; 57(2):e4-e5.

[Cole J, Ertoy D, Lin H, et al. (2000)] Lack of angiotensin II-facilitated erythropoeisis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. J Clin Invest; 106(11):1391-8.

[Criscione L, de Gasparo M, Bühlmayer P, et al. (1993)] Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT_1-receptor subtype. Br J Pharmacol; 110(2):761-71.

[Darby M, Martin JN, LaMarca B (2013)] A complicated role for the renin-angiotensin system during pregnancy: highlighting the importance of drug discovery. Expert Opin Drug Saf; 12(6):1-8.

[Debiec H, Nauta J, Coulet F, et al. (2004)] Role of truncation mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunization and antenatal glomerulopathies. Lancet; 364:1252-9.

[de Bold AJ (2011)] Thirty years of research on atrial natriuretic factor: historical background and emerging concepts. Can J Physiol Pharmacol; 89(8):527-31.

[Erin N, Turker S, Elpek O, Yildirim B (2012)] Differential changes in Substance P, VIP as well as neprilysin levels in patients with gastritis or ulcer. Peptides; 35:218-24.

[Freudenthaler SM, Schreeb K-H, Körner T, et al. (1999)] Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers. Eur J Clin Invest; 29:816-23.

[Kishimoto I, Tokudome T, Nakao K, et al. (2011)] Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models. FEBS J; 278:1830-41.

[Kuhn M (2009)] Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. Handb Exp Pharmacol; 191:47-69.

[Lafontan M, Moro C, Berlan M, et al. (2008)] Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. Cell. Trends Endocrinol Metab; 19(4):130-7.

[Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, et al. (2013)] Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. Nat Genet; 45(12):1452-8.

[Mangiafico S, Costello-Boerrigter LC, Andersen IA, et al. (2013)] Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. Eur Heart J; 34:886-93.

[Nakashima A, Kawashita H, Masuda N, et al. (2005)] Identification of cytochrome P450 forms involved in the 4-hydroxylation of valsartan, a potent and specific angiotensin II receptor antagonist, in human liver microsomes. Xenobiotica; 35(6):589-602.

[Packer M, Califf RM, Konstam MA, et al. (2002)] Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure. The omapatrilat versus enalapril randomized trial of utility in reducing events (OVERTURE). Circulation; 106:920-6.

[Porzionato A, Macchi V, Rucinski M, et al. (2010)] Natriuretic peptides in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Int Rev Cell Mol Biol; 280:1-39.

[Potter LR, Yoder AR, Flora DR, et al. (2009)] Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. Handb Exp Pharmacol; 191:341-66.

[Pu Q, Brassard P, Javeshghani DM, et al. (2008)] Effects of combined AT_1 receptor antagonist/NEP inhibitor on vascular remodeling and cardiac fibrosis in SHRSP. J Hypertens; 26(2):322-33.

[Serreau R, Luton D, Macher MA, et al. (2004)] Developmental toxicity of the angiotensin II type 1 receptor antagonists during human pregnancy: a report of 10 cases. BJOG; 112:710-2.

[Taavitsainen P, Kiukaanniemi K, Pelkonen O (2000)] *In vitro* inhibition screening of human hepatic P450 enzymes by five angiotensin-II receptor antagonists. Eur J Clin Pharmacol; 56:135-40.

[von Lueder TG, Sangaralingham SJ, Wang BH, et al. (2013)] Renin-angiotensin blockade combined with natriuretic peptide system augmentation: novel therapeutic concepts to combat heart failure. Circ Heart Fail; 6(3):594-605.

[Waldmeier F, Flesch G, Muller P, et.al. (1997)] Pharmacokinetics, disposition and biotransformation of [^{14}C]-radiolabelled valsartan in healthy male volunteers after a single oral dose. Xenobiotica; 27(1):59-71.

[Wharton W, Stein JH, Korcarz C, et al. (2012)] The effects of ramapril in individuals at risk for Alzhimer's disease: Results of a pilot clinical trial. J Alzheimers Dis; 32(1):147-56.

[Yamashiro W, Maeda K, Hirouchi M, et al. (2006)] Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT_1-receptor, in humans. Drug Metab Dispos; 34(7):1247-54.