2.6.1 緒言

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，以下 LCZ とする）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，「慢性心不全」及び「高血圧症」の適応取得を目的として開発が進められた。

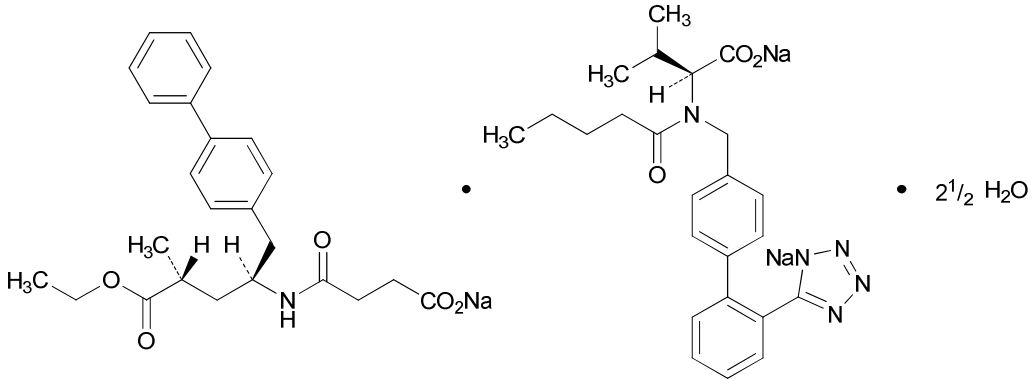
LCZ は，[redacted]個のサクビトリル構造部（アニオン），[redacted]個のバルサルタン構造部（アニオン），[redacted]個のナトリウムカチオン，及び[redacted]個の水分子から複合体を形成しており，化学名は Monosodium 4-{[(2*S*,4*R*)-1-(biphenyl-4-yl)-5-ethoxy-4-methyl-5-oxopentan-2-yl]amino}-4-oxobutanoate—disodium (2*S*)-3-methyl-2-(*N*-{[2'-(1*H*-tetrazol-1-id-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl}pentanamido)butanoate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

LCZ は，投与後速やかに溶解し，サクビトリル（AHU377，AHU）及びバルサルタン（VAL149，以下 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 sacubitrilat（LBQ657，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，本剤の用法及び用量は「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，AHU，LBQ，及び VAL の非臨床薬理試験，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評価した。非臨床試験は，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。主要な安全性薬理試験及び毒性試験は，ICH ガイドライン（S7A，S7B，M3(R2)等）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（GLP）に準拠して実施した。

Figure 1-1 LCZ の構造式



2.6.2 薬理試験の概要文

目　次

目　次 2
表 一 覧 4
図 一 覧 4
略号一覧 6
補足事項 8
1 薬理試験の概要文 9
1.1 まとめ 9
2 効力を裏付ける試験 12
2.1 生物学的標的に関する *in vitro* における作用と選択性 12
2.1.1 *In vitro* 阻害作用 12
2.2 細胞に対する作用 17
2.2.1 Ang II 誘発ラット心臓線維芽細胞のコラーゲン産生に対する LBQ，VAL，又は 2 剤併用による作用 17
2.2.2 Ang II 誘発ラット心筋細胞肥大に対する LBQ，VAL，又は 2 剤併用による作用 18
2.2.3 Ang II 誘発ウシ副腎細胞アルドステロン分泌に対する VAL の作用 18
2.2.4 Ang II 誘発ラット心房ノルアドレナリン分泌に対する VAL の作用 19
2.3 *In vivo* 薬理作用 19
2.3.1 AHU 及び VAL の *ex vivo* における NEP 阻害作用 19
2.3.2 VAL の長期反復投与による AT_1 受容体に対する影響 19
2.3.3 ANP 上昇作用 19
2.4 作用機序モデル 21
2.4.1 高食塩負荷 DSS ラットの利尿及び尿中ナトリウム排泄に対する LCZ の作用 21
2.4.2 ラットの利尿及び尿中ナトリウム排泄に対する AHU の作用 24
2.4.3 イヌの利尿及び尿中ナトリウム排泄に対する LBQ の作用 25
2.4.4 ラットの利尿及び尿中電解質排泄に対する VAL の作用 25
2.5 病態モデル 25
2.5.1 高食塩負荷 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの心負荷及び腎機能に対する作用 26
2.5.2 冠動脈結紮心筋梗塞モデルラットの心肥大に対する LCZ の作用 30
2.5.3 高食塩負荷 DSS ラットの心肥大に対する VAL の作用 31
2.5.4 脳卒中易発症性高血圧モデルラット SHRSP の血管リモデリング及び心筋線維化に対する VAL，AHU，及び VAL/AHU の作用 31
2.5.5 脳卒中易発症性高血圧モデルラット SHRSP の心肥大，腎障害，及び死亡に対する VAL の作用 34

2.5.6 冠動脈結紮心筋梗塞モデルラットの心負荷に対する VAL の作用 34
2.5.7 高血圧モデルラットの血圧に対する LCZ，AHU，及び VAL の作用 35
2.6 その他の薬理試験 36
2.6.1 薬物動態と薬力学の関連性 36
2.6.2 サロゲートマーカー 37
2.7 作用機序 42
3 副次的薬理試験 44
3.1 *In vitro* 薬理試験 44
3.2 *In vivo* 薬理試験 45
3.2.1 ブラジキニン誘発足浮腫に対する影響 46
3.2.2 ブラジキニン持続注入に対する血圧反応の増強作用 46
3.2.3 マーモセットにおける VAL の血圧に対する作用 47
4 安全性薬理試験 47
4.1 心血管系 47
4.1.1 LCZ の *in vitro* 電気生理学的試験 47
4.1.2 LCZ のサルを用いたテレメトリー試験 47
4.1.3 AHU の *in vitro* 電気生理学的試験 48
4.1.4 AHU のイヌを用いたテレメトリー試験 48
4.1.5 LBQ の *in vitro* 電気生理学的試験 48
4.2 呼吸系 49
4.2.1 LCZ のラットを用いた呼吸系に関する試験 49
4.2.2 AHU のラットを用いた呼吸系に関する試験 49
4.3 中枢神経系 49
4.3.1 LCZ の中枢神経系に関する試験 49
4.3.2 AHU の中枢神経系に関する試験 50
5 薬力学的薬物相互作用試験 50
6 考察及び結論 50
6.1 考察 50
6.2 結論 53
7 参考文献 54

表一覧

Table 2-1 AHU，LBQ，VAL，及び対照薬チオルファン並びにオマパトリラトのヒト NEP 及び NEP-2 に対する阻害作用及び NEP 選択性 14
Table 2-2 ラットにおける LCZ の ANP 上昇作用 20
Table 2-3 高食塩負荷 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの投与最終日の飲水量，尿量，及び尿中ナトリウム排泄量 22
Table 2-4 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの腎障害バイオマーカーに対する作用 30
Table 2-5 高血圧モデルラットの血圧に対する LCZ，AHU，及び VAL の作用 35
Table 3-1 LBQ，AHU，VAL，及び対照薬であるエナラプリラト，チオルファン並びにオマパトリラトの *in vitro* 酵素阻害活性（IC_{50} 値，microM） 45

図一覧

Figure 2-1 ヒト NEP 及び NEP-2 のアミノ酸配列の比較 13
Figure 2-2 NEP 及び LBQ の相互作用 15
Figure 2-3 ラット心臓線維芽細胞コラーゲン産生に対する LBQ，VAL，及び LBQ／VAL 併用の作用 17
Figure 2-4 ラット心筋細胞肥大に対する LBQ，VAL，及び LBQ／VAL 併用の作用 18
Figure 2-5 ラットに LCZ を単回経口投与したときの血漿中 ANP 濃度 20
Figure 2-6 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの血圧の変化 23
Figure 2-7 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの投与最終日の平均動脈圧 24
Figure 2-8 左室重量に対する LCZ の作用 27
Figure 2-9 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの GFR 及び ERPF 28
Figure 2-10 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの BUN に対する作用 29
Figure 2-11 冠動脈結紮心筋梗塞モデルラットにおける LCZ の心臓リモデリングに対する作用 31
Figure 2-12 脳卒中易発症性高血圧モデルラットの拡張期血圧に対する VAL，AHU，及び 2 剤併用の作用 32
Figure 2-13 脳卒中易発症性高血圧モデルラットの心筋内冠動脈の中膜／内腔比及び血管周囲間質の線維化に対する VAL，AHU，及び 2 剤併用の作用 33

Figure 2-14 脳卒中易発症性高血圧モデルラットの MMP-2 及び TIMP-2 に対する VAL，AHU，及び 2 剤併用の作用 34
Figure 2-15 カニクイザルにおける LBQ の血漿中濃度及び血漿中 NEP 阻害活性の相関 37
Figure 2-16 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を経口投与したときの初回投与後 24 時間における尿中 cGMP 38
Figure 2-17 PRA に対する LCZ，AHU，VAL，及び BEN の作用 39
Figure 2-18 血漿中 Ang II に対する LCZ，AHU，VAL，及び BEN の作用 40
Figure 2-19 血漿中アルドステロンに対する LCZ，AHU，VAL，及び BEN の作用 41
Figure 2-20 血漿中 cGMP に対する LCZ，VAL，及び BEN の作用 42
Figure 2-21 LCZ による NP 系及び RAAS の調節機構 44
Figure 3-1 ブラジキニン持続注入に対する血圧反応の増強作用 46

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）
ACE	angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
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
APN	aminopeptidase N	アミノペプチダーゼ N
APP	aminopeptidase P	アミノペプチダーゼ P
APP-2	aminopeptidase P-2	アミノペプチダーゼ P-2
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 curve	曲線下面積
Bmax	maximum number of binding sites	最大結合部位数
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
CCK	cholecystokinin	コレシストキニン
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	環状グアノシン一リン酸
Cmax	maximum serum concentration after a single dose	単回投与後の最高血漿中濃度
CNP	C-type natriuretic peptide	C 型ナトリウム利尿ペプチド
DOCA	deoxycorticosterone acetate	酢酸デオキシコルチコステロン
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
EC_{50}	50% effective concentration	50%有効濃度
ECE	endothelin converting enzyme	エンドセリン変換酵素
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
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
IDE	insulin degrading enzyme	インスリン分解酵素
KIM-1	kidney injury molecule-1	腎障害分子-1

略号	省略していない表現（英）	省略していない表現（日）
MAP	mean arterial pressure	平均動脈圧
MAP4K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼキナーゼキナーゼキナーゼ 4
MI	myocardial infarction	心筋梗塞
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
NEPi	neprilysin inhibitor	ネプリライシン阻害剤
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	natriuretic peptide receptor	ナトリウム利尿ペプチド受容体
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
PAH	para-aminohippurate	パラアミノ馬尿酸
p.o.	Latin (per os); oral dosing	経口投与
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
RBF	renal blood flow	腎血流量
RVR	renal vascular resistance	腎血管抵抗
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
TWA	time-weighted average	時間加重平均

補足事項

<table>
<tr><th>用語</th><th>定義</th></tr>
<tr><td>薬剤名の表記方法</td><td>文章及び図表中では以下の表記を用いた。
<table>
<tr><th>一般名</th><th>本書での表記</th></tr>
<tr><td>サクビトリルバルサルタンナトリウム水和物（LCZ696）</td><td>LCZ</td></tr>
<tr><td>サクビトリル（AHU377）</td><td>AHU</td></tr>
<tr><td>Sacubitrilat（LBQ657）</td><td>LBQ</td></tr>
<tr><td>バルサルタン（VAL149）</td><td>VAL</td></tr>
<tr><td>ロサルタン</td><td>LOS</td></tr>
<tr><td>ヒドロクロロチアジド</td><td>HCTZ</td></tr>
<tr><td>エナラプリル</td><td>ENA</td></tr>
<tr><td>ベナゼプリル</td><td>BEN</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>被験物質の検討濃度及び用量の表記</td><td>本概要文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塩の換算係数として 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として 1.053 及び 1.046，BEN 塩酸塩の換算係数として 1.086 を用いた。</td></tr>
</table>

1 薬理試験の概要文

1.1 まとめ

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，「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，経口投与後 AHU と VAL に解離する。AHU はプロドラッグであり，さらにネプリライシン（NEP）阻害作用を有する LBQ に代謝される。

LCZ は，LBQ の 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，また VAL のアンジオテンシン II 1 型（AT_1）受容体拮抗によりレニン・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。NP 系亢進及び RAAS 抑制は相補的に作用すると考えられ，NEP 阻害及び AT_1 受容体拮抗作用を有する LCZ は心血管系及び腎臓に対する臓器保護作用によって慢性心不全適応への有用性が期待される。

本概要文では，非臨床試験結果及び公表文献に基づき，LCZ，AHU，LBQ，及び VAL の薬理プロファイルを述べる。なお，上述のとおり LCZ は経口投与後速やかに AHU と VAL に解離するため，*in vitro* 試験では AHU，LBQ，及び VAL を用いて各標的分子への阻害作用，効力，及び選択性について評価した。また，ラット心筋細胞及び心臓線維芽細胞を用いて，心筋細胞肥大及び心臓線維芽細胞のコラーゲン産生に対する LBQ 及び VAL の作用を検討した。*In vivo* 試験では，ラット，イヌ，又はサルを用いて，血漿及び腎臓の NEP 阻害及びそれに伴う NEP の基質である心房性 NP（ANP）上昇作用，NEP 及び RAAS に対する作用，臓器障害を伴う高血圧モデルでの臓器保護作用並びに降圧効果について検討した。副次的薬理試験の *in vitro* 試験では，各種受容体，トランスポーター，及び酵素に対する AHU 及び LBQ の作用を検討した。*In vivo* 試験では，ブラジキニン誘発ラット足浮腫モデル及びブラジキニン持続注入ラットを用いて，AHU，VAL，又はこれらの 2 剤併用時のブラジキニン作用（浮腫及び血圧低下）に対する影響を検討した。安全性薬理試験では，*in vitro* 電気生理学的試験，イヌ及びサルを用いた心血管テレメトリー試験並びにラット及びマウスを用いた呼吸系及び中枢神経系の評価を行った。

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。これらの薬理プロファイルから LCZ の慢性心不全適応への有用性が示唆された。

LCZ の *in vitro* における作用

LCZ は，*in vitro* で AHU 及び VAL の部分を介して，NEP 阻害及び AT_1 受容体拮抗作用を示した。プロドラッグである AHU のヒト NEP 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 についてはいずれもヒト 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。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アンジオテンシン II（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 受容体への選択性は，Ang II 2 型（AT_2）受容体に対して約 30000 倍高かった。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。

LCZ の NP 系及び RAAS に対する作用

ラットに AHU を 30 及び 100 mg/kg（遊離塩基換算量 28.5 及び 95 mgEq/kg）の用量で単回経口投与したとき，腎皮質中の NEP 活性は 70%以上阻害された。また，ラットに LCZ を 2，6，20，及び 60 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，NEP の基質である ANP の血漿中濃度は用量依存的に上昇し，最大で 232%まで上昇した。

低ナトリウム食飼育イヌを用いて LCZ の NP 系及び RAAS に対する作用を検討した。血漿中環状グアノシン一リン酸（cGMP）の上昇を NP 系亢進の指標とし，血漿レニン活性（PRA）及び血漿アルドステロンの低下を RAAS 阻害の指標とした。その結果，LCZ 群における血漿中 cGMP は溶媒群より高値を示し，PRA 及び血漿アルドステロンは VAL 群と比べて低値を示したことから，LCZ は NP 系及び RAAS の両方に作用していることが示唆された。

LCZ の心血管系及び腎臓に対する臓器保護作用

In vitro で Ang II を介して誘発されたラット心筋細胞の肥大及び心臓線維芽細胞のコラーゲン産生は LBQ と VAL の併用処置により抑制され，その作用は LBQ 又は VAL の単独処置に比べて強かった。

LCZ は，高食塩負荷した Dahl 食塩感受性（DSS）ラットにおいて左心室肥大の抑制，糸球体濾過率（GFR）及び有効腎血漿流量（ERPF）の改善並びに腎障害バイオマーカーである腎障害分子-1（KIM-1）及び好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン（NGAL）の発現抑制を示し，腎障害に対する LCZ の保護作用が示唆された。

冠動脈結紮心筋梗塞ラットにおいて，LCZ は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。

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHRSP）に AHU と VAL を併用投与したところ，AHU 又は VAL の単独投与と比較して，心筋線維化，血管リモデリング，並びに腸間膜動脈及び冠動脈の線維化に対して改善作用が認められた。

これらの結果から，心肥大，左心室不全，並びに血管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（dTGR）に LCZ を 2～60 mg/kg の用量で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。

高血圧自然発症ラット（SHR）に LCZ を 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）の用量で 2 週間反復経口投与したところ，投与期間中に持続した動脈圧低下がみられた。

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 2 週間反復経口投与したところ，動脈圧低下がみられ，その降圧作用は VAL を 31 mg/kg の用量（VAL 曝露量として LCZ 60 mgEq/kg と同等）で投与したときに比べて強かった。

DSS ラットに LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）を 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の上昇は完全に抑制された。また，そのときの LCZ の降圧作用は，LOS あるいは HCTZ の単独投与に比べて強かった。

副次的薬理

各種受容体，トランスポーター，酵素，及びイオンチャネルに対する AHU，LBQ，及び VAL の作用を検討したところ，エンドセリン変換酵素-2（ECE-2）に対して LBQ が弱い阻害作用（IC_{50} 値：5.5 μM）を示した以外に意味のある作用は認められなかった。

血管浮腫のリスクについて，ブラジキニン誘発ラット足浮腫に対する作用及びブラジキニン注入ラットに対する血圧反応を検討したところ，AHU 及び VAL の併用投与による影響は認められなかった。一方，血管浮腫のリスクが示唆されている NEP 阻害剤オマパトリラトは，これらのモデルにおいてブラジキニンの作用を有意に増強させた。

安全性薬理

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。AHU 処理による hERG チャネルへの影響はみられず，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。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。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。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 効力を裏付ける試験

2.1 生物学的標的に関する *in vitro* における作用と選択性

2.1.1 *In vitro* 阻害作用

2.1.1.1 NEP 阻害作用

ヒトでの NEP 及び NEP-2 はペプチド内部の疎水性アミノ酸残基の前で切断を行う膜結合型のメタロペプチダーゼである。ヒト NEP 及び NEP-2 のアミノ酸配列の相同性は 51%（Figure 2-1）と非相同的であることから基質選択性も異なり，LBQ がヒト NEP に対して選択性を示す可能性はあり得る。一方，NEP 及び NEP-2 の基質は共通していることが示唆されており（Whyteside and Turner 2008），現時点ではヒト NEP 及び NEP-2 の生理的役割の差異については十分に解明されていない。したがって，LBQ は NEP-2 に対する NEP への選択性を有することが望ましい。

Figure 2-1　　ヒト NEP 及び NEP-2 のアミノ酸配列の比較

```
hNeprilysin         MGKSESQMDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYATYD-------
hNeprilysin-2       --MGKSEGPVGMVESAGRAGQKRPGFLEGGLLLLLLVTAALVALGVLYADRRGKQLPRL
                       .:*:  :  :::.    ::*   ** .* :*:**:*   *:: .***

hNeprilysin         ---------------------------DGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKY
hNeprilysin-2       ASRLCFLQEERTFVKRKPRGIPEAQEVSEVCTTPGCVIAAARILQNMDPTTEPCDDFYQF
                                                . :*.:..*: :***::****.***** **:::

hNeprilysin         ACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDILRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINE
hNeprilysin-2       ACGGWLRRHVIPETNSRYSIFDVLRDELEVILKAVLENSTAKDRPAVEKARTLYRSCMNQ
                    ******:*:*****.***. **:*******:** **::..::*  **:**::*****:*:

hNeprilysin         SAIDSRGGEPLLKLLPDIYGWPVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVG
hNeprilysin-2       SVIEKRGSQPLLDILEVVGGWPVAMDRWNETVGLEWELERQLALMNSQFNRRVLIDLFIW
                    *.*:.**.:***.:*  : ***** :.*::. * .*  *: :* :**::.::***:**:

hNeprilysin         TDDKNSVNHVIHIDQPRLGLPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDE
hNeprilysin-2       NDDQNSSRHIIYIDQPTLGMPSREYYFNGGSNRKVREAYLQFMVSVATLLREDANLPRDS
                    .**:** .*:*:**** **:***:**   *  ::.  **::**:*** *:*:: .** *.

hNeprilysin         NQLALEMNKVMELEKEIANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNF
hNeprilysin-2       CLVQEDMVQVLELETQLAKATVPQEERHDVIALYHRMGLEELQSQFGLKG----FNWTLF
                      :  :* :*:***.::*:**.  *:*:* : **::* * ::*.:*.*:     *.*  *

hNeprilysin         TNEIMSTVNISITNEEDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRT
hNeprilysin-2       IQTVLSSVKIKLLPDEEVVVYGIPYLQNLENIIDTYSARTIQNYLVWRLVLDRIGSLSQR
                     : ::*:*:*.:  :*:****.  ** :*: *: .**** :** : **:::* :.***:

hNeprilysin         YKESRNAFRKALYGTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQ
hNeprilysin-2       FKDTRVNYRKALFGTMVEEVRWRECVGYVNSNMENAVGSLYVREAFPGDSKSMVRELIDK
                    :*::*  :****:**  * . **.*..***.******* ***. **.*:** :*.:** :

hNeprilysin         IREVFIQTLDDLTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNK-LNNEYLELNYKED
hNeprilysin-2       VRTVFVETLDELGWMDEESKKKAQEKAMSIREQIGHPDYILEEMNRRLDEEYSNLNFSED
                    :* **::***:* *** *:**:*:***::*:*:**:** *:.: *: *::** :**:.**

hNeprilysin         EYFENIIQNLKFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFF
hNeprilysin-2       LYFENSLQNLKVGAQRSLRKLREKVDPNLWIIGAAVVNAFYSPNRNQIVFPAGILQPPFF
                     **** :****.. .:.*:******* : ** **********..***************

hNeprilysin         SAQQSNSLNYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQ
hNeprilysin-2       SKEQPQALNFGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFDKNGNMMDWWSNFSTQHFREQSECMIYQ
                    * :*.:::**:**********************:*:*:::***:: *:.:*:***:**:**

hNeprilysin         YGNFSWDLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQL
hNeprilysin-2       YGNYSWDLADEQNVNGFNTLGENIADNGGVRQAYKAYLKWMAEGGKDQQLPGLDLTHEQL
                    ***:*****. *:::**:************: ***:** ::: :.*::: ******.*:**

hNeprilysin         FFLNFAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEK
hNeprilysin-2       FFINYAQVWCGSYRPEFAIQSIKTDVHSPLKYRVLGSLQNLAAFADTFHCARGTPMHPKE
                    **:*:******:****:*::********* ::*::*:*** * *:::*** :.: *:*::

hNeprilysin         KCRVW
hNeprilysin-2       RCRVW
                    :****
```

ヒト NEP（NP_009220，750aa）及び NEP-2（NP_258428，779aa）のアミノ酸配列（一致スコア：51%）を示す。
*：相同アミノ酸を示す

AHU，LBQ，VAL，及び対照薬としてチオルファン並びにオマパトリラトのヒト NEP 及び NEP-2 に対する *in vitro* 阻害作用の評価結果をTable 2-1に示す。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。LBQ のヒト NEP に対する IC_{50} 値は 2.3 nM であり，プロドラッグである AHU に比べて 7000 倍以上強い阻害作用を示した。AHU はヒト NEP-2 に対し 100 µM の濃度まで 50%以上の阻害作用を示さなかった。LBQ のヒト NEP-2 に対する IC_{50} 値は 84.7 µM であり，その阻害作用は弱かった。VAL はヒト NEP 及び NEP-2 に対し 100 µM の濃度で 50%以上の阻害作用を示さなかった。対照薬のチオルファン及びオマパトリラトのヒト NEP に対する IC_{50} 値は，それぞれ 30 nM 及び 110 nM で両者とも比較的強い阻害作用を示したが，LBQ と比較するとその作用は弱かった（LBQ の IC_{50} 値 2.3 nM に対して，それぞれ 13 及び 48 倍）。また，チオルファン及びオマパトリラトのヒト NEP 選択性（NEP-2 / NEP）はそれぞれ 37 倍及び 6 倍であったのに対し，LBQ は 36000 倍以上を示していたことからヒト NEP に対する選択性が高かった [Table 2.6.3.1-RD-2013-00079]，[Table 2.6.3.1-RD-2004-50317]，[Table 2.6.3.1-RD-2005-50314]。

Table 2-1 AHU，LBQ，VAL，及び対照薬チオルファン並びにオマパトリラトのヒト NEP 及び NEP-2 に対する阻害作用及び NEP 選択性

化合物	ヒト NEP IC_{50} (nM)	ヒト NEP-2 IC_{50} (nM)	ヒト NEP 選択性 (NEP-2 / NEP)
AHU	16700 ± 2300	> 100000	NC
LBQ	2.3 ± 0.4	84700 ± 2800	36826
VAL	> 100000	> 100000	NC
チオルファン	30 ± 4	1100 ± 300	37
オマパトリラト	110 ± 20	700 ± 300	6

NEP の基質として Cys (PT14)-Arg-Arg-Leu-Trp-OH を用い，遺伝子組換えヒト NEP 及び NEP-2 の酵素活性を測定した。値は 4 回以上の独立した実験の平均値 ± 標準偏差で示す。NC：NEP IC_{50} 値が 15000 nM を超えるため算出しなかった。

Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-00079，Table 2.6.3.1-RD-2004-50317，Table 2.6.3.1-RD-2005-50314

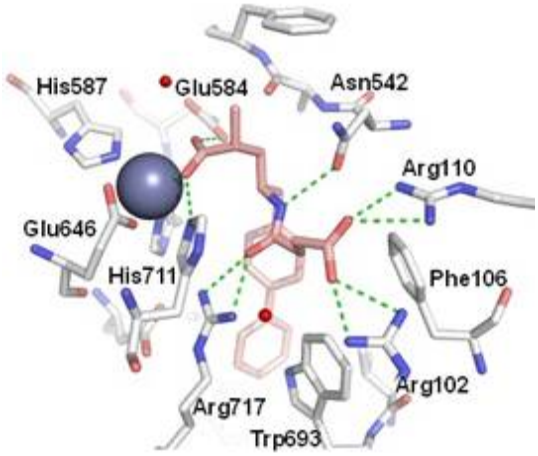
ラット及びヒト腎皮質膜画分並びにヒト血漿及び脳脊髄液における LBQ の NEP 阻害作用

ラット及びヒトの腎皮質膜画分を用いて LBQ の NEP 阻害作用を検討した。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 [Table 2.6.3.1-RD-2005-50314]。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 [Table 2.6.3.1-RD-2013-00079]，[Table 2.6.3.1-RD-2014-00338]。ヒト血漿サンプルで IC_{50} 値に乖離が見られた要因として，LBQ のヒト血漿蛋白結合率は 97%と高く [2.6.4-4.1 項]，血漿中の遊離型 LBQ 濃度が低下したためと考えられた。

NEP の活性部位及び結合様式

ヒト組換え NEP と LBQ の共結晶を作製し，分解能 2.0 Å で X 線構造解析した結果，LBQ は競合阻害の様式で酵素活性部位に結合していることが示された（Figure 2-2）。NEP の Trp693 は，LBQ のビフェニル基を収容する領域を作るため，誘導適合（induced-fit）による立体構造変化を生じている。また，LBQ の α-メチルカルボン酸は，触媒としての亜鉛に酸素を介して配位している。このように，LBQ は NEP の活性部位に複雑に入り込み，NEP を強力に阻害するものと考えられる [Table 2.6.3.1-RD-2013-00252]。

Figure 2-2　　NEP 及び LBQ の相互作用



ヒト組換え NEP と LBQ の X 線構造。NEP に入り込んだ LBQ（ピンク色）の模式図。LBQ は炭素原子で示す。亜鉛は球体（灰色）で示し，重要な相互作用は点線（緑色）で示す。

Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-00252

2.1.1.2 AT_1 受容体拮抗作用及び選択性

AHU 及び LBQ のヒト AT_1 受容体に対する IC_{50} 値は，いずれも 30 μM 以上であった [Table 2.6.3.1-RD-2012-50571]，[Table 2.6.3.1-RD-2012-50566]。

選択的かつ競合的な AT_1 受容体拮抗薬である VAL を用いたラット大動脈平滑筋細胞膜画分を用いた検討では，VAL の AT_1 受容体に対する Ki 値は 2.38 nM であり，AT_2 受容体に対する AT_1 受容体選択性は約 30000 倍高かった（Criscione et al. 1993）。また，培養ラット血管平滑筋細胞での検討では VAL の AT_1 受容体に対する Ki 値は 7.33 nM であり，AT_2 受容体に対する AT_1 受容体選択性は約 10000 倍高かった [Table 2.6.3.1-RD-1990-02642]。

VAL の AT_1 受容体拮抗作用における動物間種差をラット，イヌ，マーモセット，及びヒトの副腎，ラット，イヌ，及びマーモセットの肝臓，並びにラットの動脈平滑筋細胞を用いて検討したところ，イヌを除き，検討したすべての動物種・器官で Ki 値は 1.17～7.11 nM であり，ほぼ同等であった。イヌの副腎での阻害作用はヒト副腎に比べて 31 倍弱かった［Ki 値：57.9 nM（イヌ），1.87 nM（ヒト）］[Table 2.6.3.1-PKF-95-03259]。

ウサギ大動脈輪を用いた *in vitro* 試験において，VAL は Ang II 誘発性血管収縮に対する抑制作用を示し，その IC_{50} 値は 1.4 nM であった。一方，ノルアドレナリン，セロトニン，あるいは塩化カリウムに対する作動又は阻害活性は 2 μM（1500 倍）までみられなかった [Table 2.6.3.1-RD-1990-02643]。

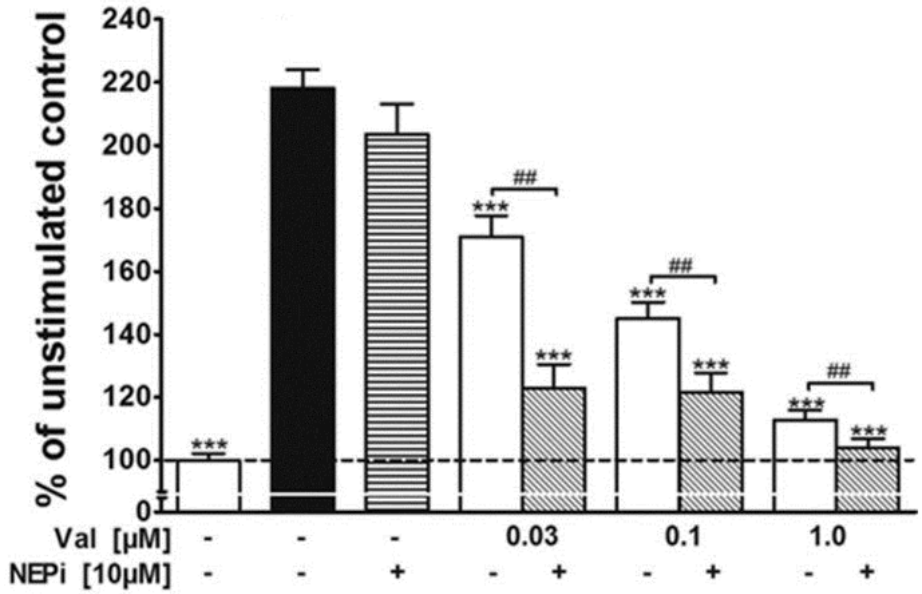
VAL の光学異性体（R 体）の AT_1 受容体拮抗作用は，VAL に比べて，ラット大動脈平滑筋細胞膜画分での検討では 138 倍（Ki 値：330 nM）及びウサギ大動脈輪を用いた検討では 71 倍（IC_{50} 値：100 nM）それぞれ弱かった [Table 2.6.3.1-PKF-95-03261]。

2.2 細胞に対する作用

2.2.1 Ang II 誘発ラット心臓線維芽細胞のコラーゲン産生に対する LBQ，VAL，又は 2 剤併用による作用

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に対する LBQ，VAL，及びこれら 2 剤併用による作用について検討した（von Lueder et al. 2013）。新生仔ラット心臓から単離した線維芽細胞に Ang II を 100 nM で処置し，心臓線維芽細胞のコラーゲン産生を ^{3}H-プロリンの取り込みを指標に評価した。LBQ 単独では，心臓線維芽細胞のコラーゲン産生に対する抑制作用はみられなかった。VAL は単独で心臓線維芽細胞のコラーゲン産生を濃度依存的に抑制し，その抑制作用は LBQ の併用により増強した（Figure 2-3）。

Figure 2-3 ラット心臓線維芽細胞コラーゲン産生に対する LBQ，VAL，及び LBQ／VAL 併用の作用



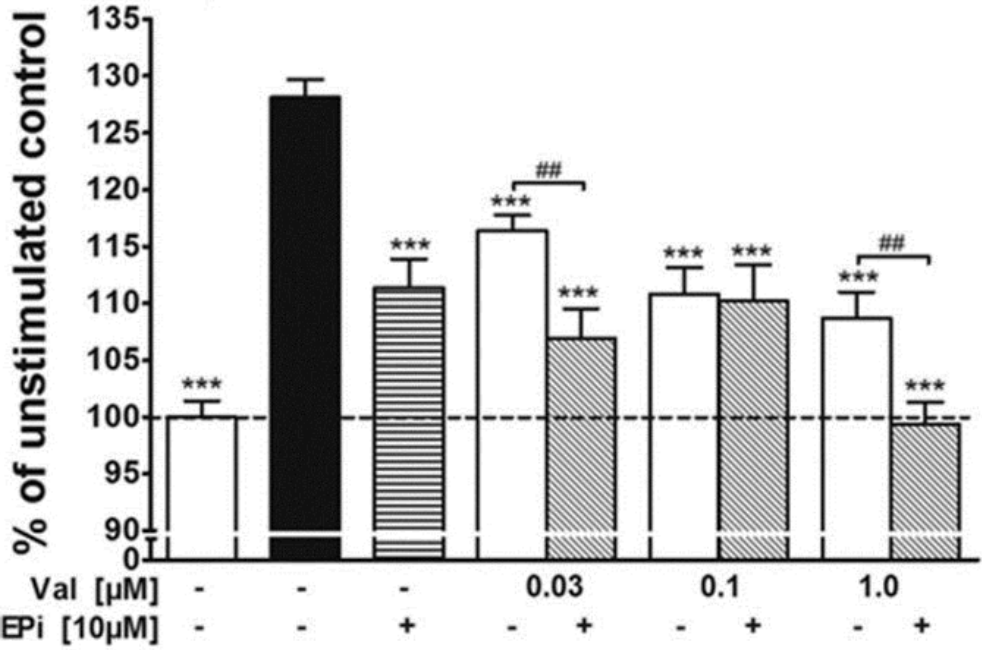
単離ラット心臓線維芽細胞に Ang II を処置し誘発させたコラーゲン産生に対する LBQ（NEPi）及び VAL（Val）の影響を ^{3} H-プロリン取り込みを指標に評価した。値は非刺激対照（最左側白抜きカラム）を 100%とした平均値 ± 標準誤差で示す。***：$p < 0.001$ vs. Ang II-刺激対照群（黒カラム），##：$p < 0.01$ VAL / LBQ 併用群 vs VAL 単独群（*t* 検定）。

Source : von Lueder et al. 2013

2.2.2 Ang II 誘発ラット心筋細胞肥大に対する LBQ，VAL，又は 2 剤併用による作用

Ang II を介して誘発されたラット心筋細胞の肥大に対する LBQ，VAL，及びこれら 2 剤併用による作用について検討した（von Lueder et al. 2013）。新生仔ラットから単離した心筋細胞に Ang II を 100 nM で処置し，心筋細胞肥大を ^{3}H-ロイシンの取り込みを指標に評価した。LBQ 10 µM 単独では，心筋細胞肥大に対して約 50%の抑制がみられた。VAL 単独では，1 µM で約 60%の心筋細胞肥大抑制がみられた。VAL の 0.03 及び 1 µM での抑制作用は LBQ 10 µM の併用により有意に増強された（Figure 2-4）。

Figure 2-4 ラット心筋細胞肥大に対する LBQ，VAL，及び LBQ／VAL 併用の作用



単離ラット心筋細胞に Ang II を処置し誘発させた心筋細胞肥大に対する LBQ（NEPi）及び VAL（Val）の影響を ^{3}H-ロイシン取り込みを指標に評価した。値は非刺激対照（最左側の白抜きカラム）を 100%としたときの平均値 ± 標準誤差で示す。***： $p < 0.001$ vs. Ang II-刺激対照群（黒カラム），##： $p < 0.01$ VAL / LBQ 併用群 vs VAL 単独群（*t* 検定）。

Source : von Lueder et al. 2013

2.2.3 Ang II 誘発ウシ副腎細胞アルドステロン分泌に対する VAL の作用

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 [Table 2.6.3.1-RD-1991-03230]。

2.2.4 Ang II 誘発ラット心房ノルアドレナリン分泌に対する VAL の作用

ラット摘出左心房標本は電気刺激によりノルアドレナリンを分泌し，この分泌は Ang II（1～1000 nM）により亢進された。VAL は Ang II（100 nM）により亢進されるノルアドレナリン分泌に対して濃度依存的（10～1000 nM）に阻害し，その IC_{50} 値は 7 nM であった。したがって，VAL は末梢交感神経からのノルアドレナリンの Ang II による分泌促進を強力に阻害することが示唆された [Table 2.6.3.1-RD-1999-02484]。

2.3 *In vivo* 薬理作用

2.3.1 AHU 及び VAL の *ex vivo* における NEP 阻害作用

雄性 Sprague-Dawley（SD）ラット（350～400 g）に溶媒（3%コーンスターチ）及び AHU を 30 及び 100 mg/kg（遊離塩基換算量 28.5 及び 95 mgEq/kg）の用量で単回経口投与した（各群 4 例）。投与後 60 分における腎皮質の NEP 活性を *ex vivo* で測定したところ，NEP 活性はそれぞれ 73 及び 84%阻害された。VAL を 30 mg/kg の用量で投与したところ NEP 活性に対する影響はみられなかった。また，AHU 100 mg/kg（遊離塩基換算量 95 mgEq/kg）と VAL 30 mg/kg を併用投与したときの NEP 阻害作用に併用投与による影響は認められなかった [Table 2.6.3.1-RD-2005-50315]。

2.3.2 VAL の長期反復投与による AT_1 受容体に対する影響

11 週齢の雄性 SHR 6 例に VAL（溶媒：5%アラビアガム溶液）を 10 mg/kg の用量で 27 日間反復経口投与した。投与終了後に副腎，大動脈，及び腎臓を採取し，それらの膜画分における Ang II の AT_1 受容体に対する結合活性を検討した。Ang II 結合における Kd（平衡解離定数）及び Bmax（最大結合部位数）はいずれの部位においても VAL 群及び溶媒群で有意な差はみられず，VAL は長期反復投与により AT_1 受容体の親和性及び受容体数に影響を及ぼさないことが示唆された [Table 2.6.3.1-PKF-95-03262]。

2.3.3 ANP 上昇作用

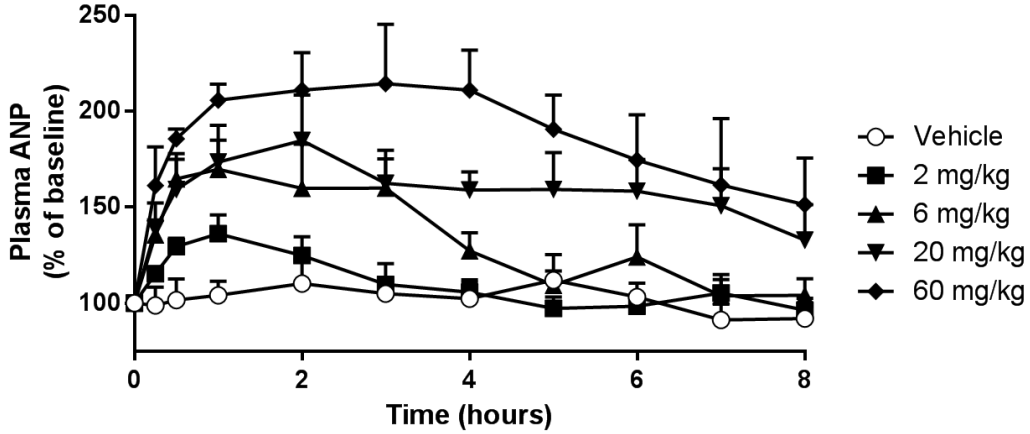
2.3.3.1 ラット血漿中 ANP 濃度に対する LCZ の作用

ANP は血圧上昇に反応して主に心房から分泌されるホルモンであり，血管拡張，利尿，並びに尿中ナトリウム排泄等さまざまな生理活性を有する。通常，ANP は NP 受容体 C（NPR-C）等のクリアランス受容体や NEP 等の分解酵素を介して速やかに消失する。そのため，ANP を指標とした評価には，ANP を一定の速度で持続注入して受容体を介在するクリアランス経路を飽和させる必要がある。そこで，本試験では雄性 SD ラット（460～630 g）に ANP を 450 ng/kg/min の速度で持続静注し，ゼラチンカプセルに充填した LCZ（2，6，20，及び 60 mg/kg）を単回経口投与したときの血漿中 ANP 濃度に対する作用を検討した [Table 2.6.3.1-RD-2006-51044]。

LCZ 投与後，血漿中 ANP 濃度は速やかに上昇し，1～3 時間で最高値に達した。2 mg/kg 群では，血漿中 ANP 濃度は平均 137%まで上昇し，投与後 4 時間以内にベースラインまで低下した。6 及

び 20 mg/kg 群では，血漿中 ANP 濃度は 150%以上まで上昇し，その上昇作用は少なくとも投与後 4 時間まで持続した。最高用量の 60 mg/kg 群では，血漿中 ANP 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（Figure 2-5，Table 2-2）。LCZ の用量と血漿中 ANP 濃度を用いた回帰分析から，ANP を 20，50，及び 100%上昇させるために必要な LCZ の用量はそれぞれ，0.9，2.8，及び 16.7 mg/kg と推定された。

Figure 2-5　　ラットに LCZ を単回経口投与したときの血漿中 ANP 濃度



雄性 SD ラットに ANP を 450 ng/kg/min の速度で 9 時間持続静注し，静注開始 1 時間後に LCZ 又は溶媒（ゼラチンカプセル）を単回経口投与した。血漿中の ANP 濃度を酵素免疫法により経時的に測定した。値はベースラインを 100%としたときの被験物質投与開始から投与後 8 時間までの ANP 濃度の変化率（%）を平均値 ± 標準誤差で示す（各群 n = 4）。

Source : Table 2.6.3.1-RD-2006-51044

Table 2-2　　ラットにおける LCZ の ANP 上昇作用

投与群	ANP 濃度のピーク値 (%)	ANP 濃度の 0-4 時間 TWA (%)	ANP 濃度の 0-8 時間 TWA (%)
溶媒	126 ± 9	105 ± 10	103 ± 8
2 mg/kg	137 ± 9	120 ± 6	110 ± 6
6 mg/kg	176 ± 15	155 ± 16	134 ± 12
20 mg/kg	207 ± 17	166 ± 16	160 ± 9
60 mg/kg	232 ± 26	202 ± 16	189 ± 20

血漿中 ANP 濃度のピーク値並びに投与後 4 及び 8 時間にわたる時間加重平均（TWA）のベースライン値に対する割合（%）を平均値 ± 標準誤差で示す（各群 n = 4）。

Source : Table 2.6.3.1-RD-2006-51044

2.3.3.2　ラット血漿中 ANP 濃度に対する AHU の作用

雄性 SD ラット（269～372 g）に溶媒（3%コーンスターチ）及び AHU を 1～30 mg/kg（遊離塩基換算量 0.9～28.5 mgEq/kg）の用量で単回経口投与し（各群 2～6 例），血漿中 ANP 濃度を測定した。投与 0～4 時間での ANP 濃度の時間加重平均（TWA）のベースライン値に対する 1，3，10，及び 30 mg/kg における増加量（%，平均値 ± 標準誤差）は，それぞれ 34 ± 5，35 ± 3，66 ± 21，及び 80 ± 14 であり，10 及び 30 mg/kg 群では溶媒群に対して有意に増加した（$p < 0.05$，

Tukey 検定）。したがって，AHU 投与によるラット循環血中の ANP 上昇は NEP 阻害によるものであることが示唆された [Table 2.6.3.1-RD-2002-50641]。

2.3.3.3 イヌ血漿中 ANP 濃度に対する AHU の作用

麻酔下の雑犬（15.3～20.0 kg）に溶媒（3%コーンスターチ）及び AHU を 3～30 mg/kg（遊離塩基換算量 2.8～28.5 mgEq/kg）の用量で単回十二指腸内投与し（各群 2 又は 3 例），血漿中 ANP 濃度を測定した。投与 0～5 時間の ANP 濃度の時間加重平均（TWA）のベースライン値に対する 3，10，及び 30 mg/kg における増加量（%，平均値 ± 標準誤差）は，それぞれ 16 ± 6，48 ± 10，及び 101 ± 16 であり，用量依存的な増加が認められた。また，10 及び 30 mg/kg 群では溶媒群に対して有意に増加した（$p < 0.05$，Tukey 検定）。したがって，AHU 投与によるイヌ循環血中の ANP 上昇は NEP 阻害によるものであることが示唆された [Table 2.6.3.1-RD-2002-50641]。

2.4 作用機序モデル

2.4.1 高食塩負荷 DSS ラットの利尿及び尿中ナトリウム排泄に対する LCZ の作用

高食塩負荷により高血圧を呈した 11 週齢の雄性 DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，又は LOS 及び HCTZ の 2 剤併用（以下 LOS / HCTZ）を 4 週間反復経口投与し，飲水量，尿量，尿中ナトリウム排泄量，及び平均動脈圧に対する影響を検討した [Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]。高食塩食（4% NaCl 含有）給餌は投与 3 週間前から開始し，4 週間の反復投与中も継続した。正常対照群には正常食塩食（0.49% NaCl 含有）を与えた。

高食塩を負荷した DSS ラットでは，飲水量，尿量，及び尿中ナトリウム排泄量の増加が認められた（Table 2-3）。4 週間反復投与の最終日において，LOS / HCTZ 群で尿量の減少がみられた以外，いずれの群も飲水量，尿量，及び尿中ナトリウム排泄量に対して明らかな作用は認められなかった。

Table 2-3 高食塩負荷 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの投与最終日の飲水量，尿量，及び尿中ナトリウム排泄量

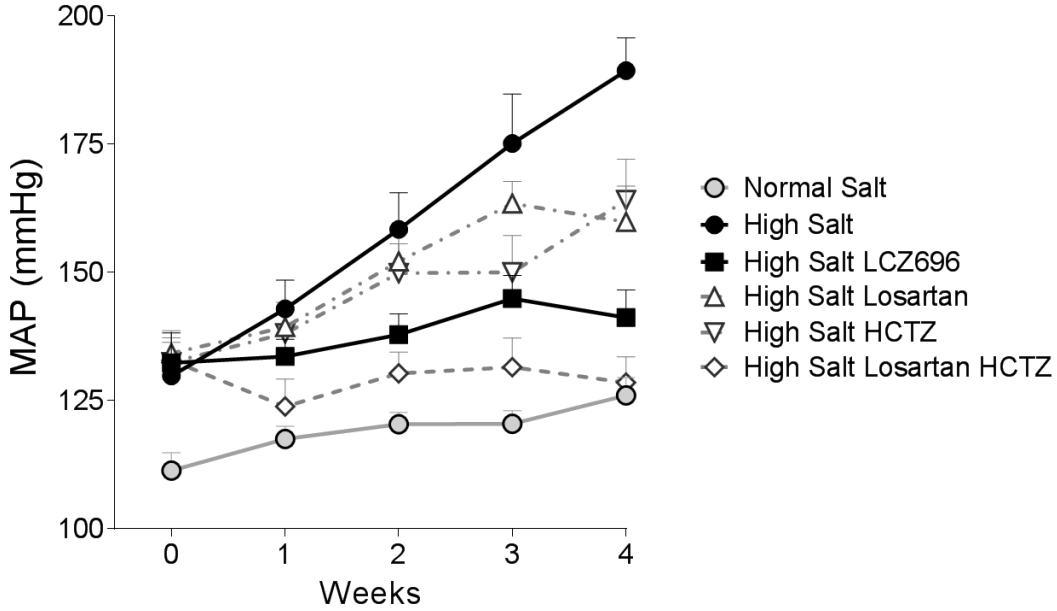
投与群	飲水量 (mL/day)	尿量 (mL/day)	尿中ナトリウム排泄量 (mmol/day)
正常食塩	30.4 ± 1.1	13.7 ± 1.2	1.4 ± 0.1
高食塩溶媒	53.0 ± 6.4 *	39.6 ± 3.5 *	7.4 ± 0.7 *
高食塩 LCZ	54.3 ± 3.8 *	36.9 ± 1.7 *	7.4 ± 0.7 *
高食塩 LOS	54.2 ± 5.3 *	42.4 ± 4.2 *	8.3 ± 0.6 *
高食塩 HCTZ	46.3 ± 4.3 *	32.7 ± 3.8 *	7.7 ± 0.4 *
高食塩 LOS / HCTZ	42.3 ± 2.7 *	28.9 ± 1.8 *#	8.1 ± 0.4 *

各群 n = 13~16。値は平均値 ± 標準誤差で示す。*：$p < 0.05$ vs.正常食塩群，#：$p < 0.05$ vs.高食塩溶媒群（Newman-Keuls 法）。

Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-50369

高食塩群では，高食塩食開始 3 週間後の平均動脈圧が正常食塩群に比べて 23 mmHg 上昇した。被験物質投与開始から 4 週間の平均動脈圧の経時的変化をFigure 2-6に示す。高食塩負荷 DSS ラットでは，4 週間の投与期間中に平均動脈圧が 63 mmHg 上昇したが，LCZ 群では血圧上昇が抑制され，投与初日のベースライン時からの平均動脈圧変動値は 9mmHg であった。この LCZ 投与による平均動脈圧の変動値は，正常食塩食を摂取した DSS ラットの平均動脈圧変動値 15 mmHg とほぼ同程度であった [Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]。

Figure 2-6 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの血圧の変化

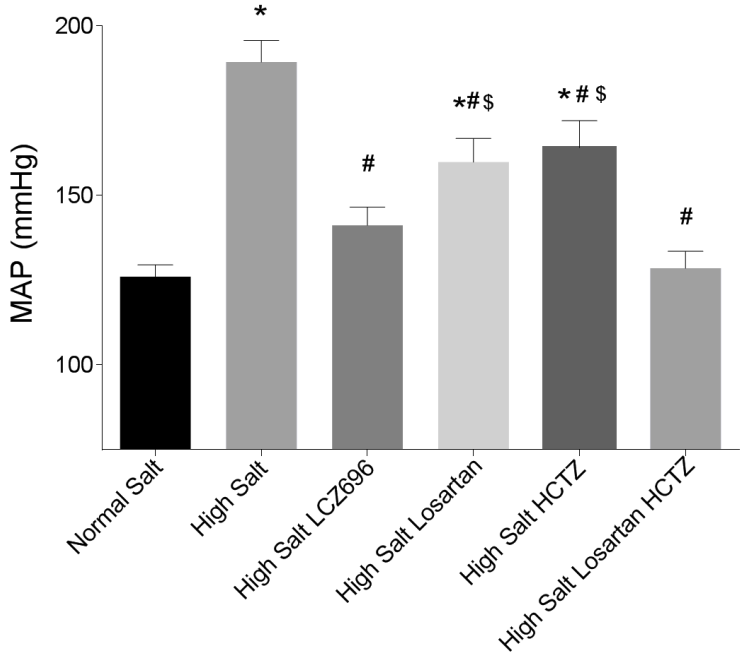


DSS ラットに正常食塩食（0.49% NaCl 含有）又は高食塩食（4% NaCl 含有）を 7 週間与えた。高食塩負荷開始 3 週間後（week 0）から DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，及び LOS / HCTZ 併用の 4 週間反復経口投与（week 0-4）を行ったときの平均動脈圧（MAP）の経時変化。血圧はテールカフを用いて測定した。値は平均値 ± 標準誤差で示す（各群 n = 11~16）。

Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-50369

投与最終日の平均動脈圧は，すべての投与群で溶媒群と比較して有意に低下した（Figure 2-7）。LCZ 群及び LOS/HCTZ 群では，平均動脈圧の上昇が正常食塩群と有意差がみられない程度まで抑制された。また，これらの群の平均動脈圧は LOS 又は HCTZ の単独投与群よりも低値であった [Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]。

Figure 2-7　　DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの投与最終日の平均動脈圧



DSS ラットに正常食塩食（0.49% NaCl 含有）又は高食塩食（4% NaCl 含有）を 7 週間与えた。高食塩負荷開始 3 週間後（week 0）から DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，及び LOS / HCTZ 併用の 4 週間反復経口投与（week 0-4）を行ったときの投与最終日の平均動脈圧（MAP）。血圧はテールカフを用いて測定した。値は平均値 ± 標準誤差で示す（各群 n = 11~16）。
*：$p < 0.05$ vs.正常食塩群，#：$p < 0.05$ vs.高食塩群，$：$p < 0.05$vs. LCZ 群（Newman-Keuls 法）。
Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-50369

2.4.2　　ラットの利尿及び尿中ナトリウム排泄に対する AHU の作用

雄性 SD ラット（294～364 g）を用い，麻酔下で大腿動脈，大腿静脈，及び膀胱内にカテーテルを挿入して，平均動脈圧測定，ANP 投与，及び採尿を行った。尿量増加及び尿中ナトリウム排泄促進のため，試験期間中は生理食塩液を持続静注（毎分 33 µL）した。平均動脈圧及び尿量が安定したところで溶媒（3% コーンスターチ）及び AHU 30 mg/kg（遊離塩基換算量 28.5 mgEq/kg）を十二指腸内投与し（各群 14 例），投与 1 時間後に ANP を 1 µg/kg の用量で静脈内投与した。ANP 投与による平均動脈圧の変動は，AHU 群と溶媒群の間で差が無く，AHU の平均動脈圧に対する作用は認められなかった。ANP 投与による尿量増加は，溶媒群に比べて AHU 群で増強される傾向がみられたが，統計学的有意差はみられなかった。尿中ナトリウム排泄量については，溶媒群で 4.5 倍（0.72 µEq/kg/min から 3.26 µEq/kg/min）上昇し，溶媒群と比較して AHU 群では有意な増強（$p < 0.05$，*t* 検定）が認められた（0.63 µEq/kg/min から 8.84 µEq/kg/min）[Table 2.6.3.1-RD-2002-50823]。

2.4.3 イヌの利尿及び尿中ナトリウム排泄に対する LBQ の作用

雄性雑犬に ANP の静脈内投与を開始した後，溶媒（0.25 M 炭酸水素ナトリウム溶液）又は LBQ 10 mg/kg を静脈内投与した（溶媒群 15 例，LBQ 群 11 例）。ANP の投与により尿中ナトリウム排泄量及び尿量が増加し，この ANP による尿中ナトリウム排泄作用及び利尿作用は，溶媒群に比べて LBQ 群で有意に増強された（Ksander et al. 1995）。

2.4.4 ラットの利尿及び尿中電解質排泄に対する VAL の作用

雌性 Tif: RAIf (SPF) 系ラット（145～165 g）に溶媒（0.5%メチルセルロース溶液）及び VAL を 3，10，30，及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与し（各群 7 又は 8 例），投与後 3 時間まで及びその後 6 時間までの尿について，尿量，尿中ナトリウム，カリウム，及びクロールの排泄量を測定した。最初の 3 時間尿では，いずれの群においても VAL 投与の影響は認められなかった。次の 3 時間（投与後 3～6 時間）の尿では，溶媒群に比べて，30 mg/kg 群でナトリウム及びクロール排泄量の減少，100 mg/kg 群で尿量並びにナトリウム及びクロール排泄量の減少が認められた [Table 2.6.3.1-RD-1990-02641]。

2.5 病態モデル

LCZ，AHU，及び VAL の臓器保護作用について，以下の病態モデルを用いて評価した。Dahl 食塩感受性（DSS）ラットは高食塩負荷により進行性の心血管障害及び腎障害を発現する。脳卒中易発性症高血圧モデルラット（SHRSP）は脳卒中による死亡が高率に発生し，心血管障害が進行性に発現する。また，心筋梗塞（MI）モデルラットは心臓のリモデリング及び心筋障害等の心不全の病態を呈し，心筋梗塞患者の病態に類似する。

心筋梗塞後心不全モデルラットに対する心機能改善作用

高血圧自然発症ラット（SHR）を用いて左冠動脈前下行枝（LAD）を結紮することにより心不全を誘発させた心筋梗塞後心不全モデル SHR に，LCZ を 68 mg/kg/日（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg/日）の用量で結紮 4 週後より 8 週間反復経口投与を行った。その結果，LCZ は，VAL と比較して有意に左室駆出率（left ventricular ejection fraction，LVEF）の低下を抑制した。さらに，LCZ は左室拡張末期径（left ventricular end-diastolic diameter，LVEDD），左室収縮末期径（left ventricular end-systolic diameter，LVESD），左室拡張末期圧（left ventricular end-diastolic pressure，LVEDP），左室弛緩時定数（Tau）といった心機能パラメータを有意に改善し，投与後 4 週及び 8 週では NT-proBNP の上昇を抑制した（Trivedi et al. 2018）。

同様の結果は，急性心筋梗塞後心不全モデルラットを用いた短期間の投与試験（von Lueder et al. 2013，von Lueder et al. 2015，Kompa et al. 2018，Pfau et al. 2019）でも認められている。SD ラットを用いて作製された心不全モデルに LCZ を 4 週間投与することによって左室径の改善，LVEF の保持，及び左室肥大抑制が認められた（von Lueder et al. 2015）。同モデルに LCZ を 4 週間投与すると，LVEF 及び左室内径短縮率（fractional shortening，FS）の改善が認められ，これら

の作用は ACE 阻害剤である perindopril よりも有意であった（Kompa et al. 2018）。Lewis ラットの心不全モデルでは，LCZ の 5 週間投与によって溶媒よりも有意な左室径及び LVEF の改善が認められた（Pfau et al. 2019）。

圧負荷誘発性心不全モデルラットに対する心機能改善作用

SD ラットの腹部大動脈を部分狭窄することにより作製した圧負荷誘発性心不全モデルに，VAL，AHU，又は LCZ を 4 週間反復経口投与したところ，LCZ は dP/dt max 及び min（左室圧の最大及び最小増加率）を改善し，LCZ 及び AHU は運動耐容能を増加させた（Maslov et al. 2018）。

種々の心不全モデルマウスに対する心機能改善作用及び予後改善作用

LCZ の心機能改善作用は心不全モデルマウスでも検討されている。糖尿病性心不全モデルマウスを用いた検討では溶媒と比較して LCZ の有意な LVEF の改善作用を示し，VAL よりも NT-proBNP を低下させた（Suematsu et al. 2016）。マウスの大動脈縮窄（TAC）モデルに AHU と VAL の併用又は VAL を単独で投与したのち免疫組織化学的手法，遺伝子発現解析及び心エコーにより心臓の繊維化及び心機能に対する影響を検討したところ，AHU と VAL の併用は VAL 単独と比較して心臓の線維化を有意に抑制し，LVEF 及び FS を有意に改善した（Burke et al. 2019）。また，LAD の永久結紮により心筋梗塞を誘発させた心筋梗塞後心不全モデルマウスにおいて，LCZ は FS 低下を抑制し，ENA よりも生存率を改善した（Ishii et al. 2017）。

心筋梗塞後心不全モデルウサギに対する心機能改善作用

New Zealand White ウサギを用いて LAD を 45 分間バルーン閉塞することにより作製した急性心筋梗塞後心不全モデルにおいて，LCZ は VAL と比較して有意に LVEF を改善し，心筋梗塞サイズを減少させた（Torrado et al. 2018）。

以上より，これらの試験成績及び公表文献では LCZ のさまざまな心不全モデル動物に対する心機能及び予後の改善が認められていることから，心不全の患者においても予後改善が期待できるものと思われる。

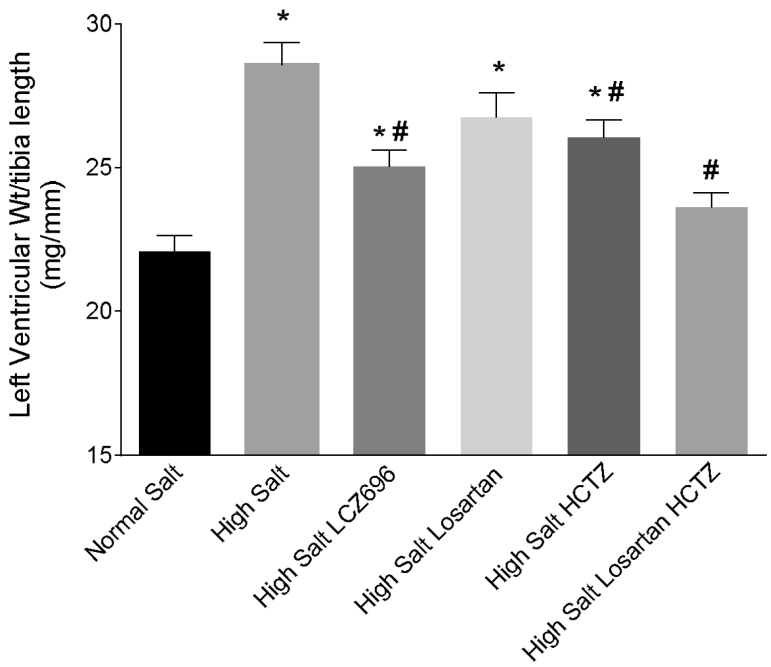
2.5.1 高食塩負荷 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの心負荷及び腎機能に対する作用

高食塩負荷により高血圧を呈した 11 週齢の雄性 DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，又は LOS 及び HCTZ の 2 剤併用（以下 LOS / HCTZ）を 4 週間反復経口投与し，心負荷及び腎機能に対する影響を検討した。高食塩食（4% NaCl 含有）給餌は投与 3 週間前から開始し，4 週間の反復投与中も継続した。正常対照群には，正常食塩食（0.49% NaCl 含有）を与えた。

心室肥大に対する作用：高食塩負荷により DSS ラットの溶媒群の左室重量は，正常食塩群と比べて 29%増加した。LCZ，HCTZ，及び LOS / HCTZ の 4 週間反復投与により，高食塩負荷に

よる左室重量増加は有意に抑制され，その抑制率はそれぞれ 11，10，及び 17%であった。一方，LOS による左室重量に対する作用は認められなかった（Figure 2-8）。高食塩負荷による左室重量増加とともに，心肥大に伴う心房伸展により分泌される N 末端プロ心房性 NP（NT-proANP）値の上昇が認められた。正常食塩群の NT-proANP 値が 17.2 ng/mL であったのに対し，高食塩群は 51.4 ng/mL であり正常食塩群に比べて 3 倍上昇した。LCZ 及び LOS / HCTZ 群の NT-proANP 値はそれぞれ 32.8 及び 24.6 ng/mL であり，いずれも高食塩負荷による NT-proANP 上昇を抑制する傾向が認められた。一方，LOS 及び HCTZ 群の NT-proANP 値はそれぞれ 45.1 及び 43.1 ng/mL であり，影響は認められなかった [Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]。

Figure 2-8　　左室重量に対する LCZ の作用



DSS ラットに正常食塩食（0.49% NaCl 含有）又は高食塩食（4% NaCl 含有）を 7 週間与えた。高食塩負荷 3 週間後（week 0）から DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，及び LOS / HCTZ 併用の 4 週間反復経口投与（week 0-4）を行ったときの投与最終日の左室重量を測定した。値は平均値 ± 標準誤差で示す（各群 n = 14~16）。* : $p < 0.05$ vs.正常食塩群，# : $p < 0.05$ vs.高食塩群（Newman-Keuls 法）。

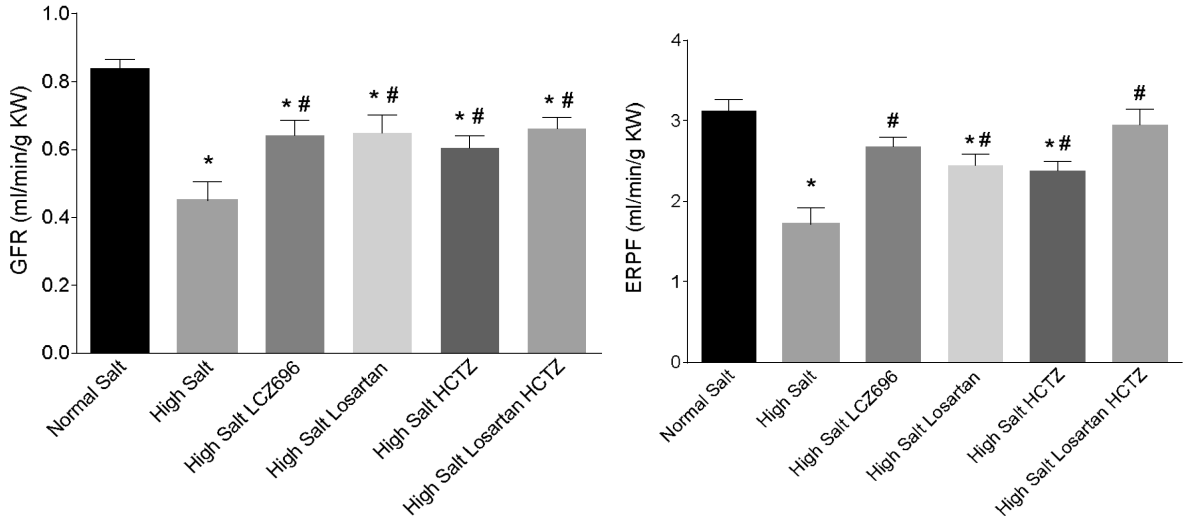
Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-50369，図は改変して使用した。

腎機能：4 週間反復経口投与後の腎機能を検討するため，^{3}H-イヌリン及び ^{14}C-パラアミノ馬尿酸（PAH）をトレーサーとして用いたクリアランス試験により糸球体濾過率（GFR）及び有効腎血漿流量（ERPF）を測定した。腎機能評価日に，溶媒又は被験物質（LCZ，LOS，HCTZ，又は LOS / HCTZ）をラットに投与した後，トレーサーを投与した。

高食塩負荷 DSS ラットの GFR は，正常食塩摂取の DSS ラットと比べて 47%低下した（Figure 2-9）。高食塩負荷による GFR 低下は，LCZ 群で約 50%改善したが，他の被験物質群と同程度であり，明らかな差は認められなかった。

高食塩負荷により ERPF は 45%減少した。この高食塩負荷による ERPF 減少は，LCZ を含むすべての群で有意に改善された。LCZ 及び LOS / HCTZ 群では，正常食塩群と比較して有意差がない程度までの改善がみられ，ERPF の減少率はそれぞれ 14 及び 6%であった。一方，LOS 及び HCTZ 群の改善は部分的であり，それぞれ 22 及び 24%であった（$p < 0.05$ vs.正常食塩群）（Figure 2-9，[Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]）。

Figure 2-9　DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの GFR 及び ERPF



DSS ラットに正常食塩食（0.49% NaCl 含有）又は高食塩食（4% NaCl 含有）を 7 週間与えた。高食塩負荷開始 3 週間後（week 0）から DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，及び LOS / HCTZ 併用の 4 週間反復経口投与（week 0-4）を行ったときの投与最終日の GFR（左図）及び ERPF（右図）を，^{3}H-イヌリン及び ^{14}C-PAH をトレーサーとしてクリアランス法により評価した。値は平均値 ± 標準誤差で示す（各群 n = 7~8）。*：$p < 0.05$ vs.正常食塩群，#：$p < 0.05$ vs.高食塩群（Newman-Keuls 法）。

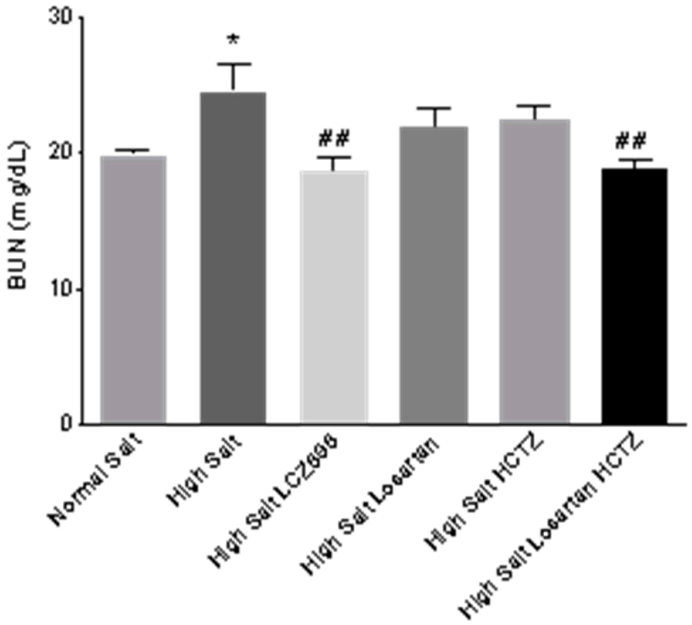
Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-50369，図は改変して使用した。

4 週間反復経口投与の投与最終日における腎血流量（RBF）及び腎血管抵抗（RVR）をそれぞれ計算式 ERPF /（1-ヘマトクリット値）及び平均動脈圧 / RBF から算出したところ，高食塩負荷 DSS ラットの RBF は正常食塩摂取の DSS ラットと比べて 50%減少し，RVR は 2 倍に上昇した（$p < 0.05$ vs.正常食塩群）。この RBF の減少及び RVR の上昇は，HCTZ 群を除くすべての群で正常食塩群と比較して有意差のない程度まで改善され，群間で差は認められなかった。

投与 3 週目及び投与最終日の投与終了時における血液尿素窒素（BUN）に対する作用を検討したところ，高食塩負荷により DSS ラットの BUN は有意に上昇し，その上昇率は 24%であった。LCZ 及び LOS / HCTZ 群は，高食塩負荷による BUN の上昇を有意に抑制した。一方，LOS 及び

HCTZ の単独投与による BUN への作用は認められなかった（Figure 2-10，[Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]）。

Figure 2-10　DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの BUN に対する作用



DSS ラットに正常食塩食（0.49% NaCl 含有）又は高食塩食（4% NaCl 含有）を 7 週間与えた。高食塩負荷開始 3 週間後（week 0）から DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，及び LOS / HCTZ 併用を 4 週間反復経口投与（week 0-4）し，投与 3 及び 4 週目の投与終了時に BUN を測定した。値は投与 3 及び 4 週目のそれぞれの投与最終日に測定した BUN の平均値 ± 標準誤差を示す（各群 n = 13~16）。

*：$p < 0.05$ vs.正常食塩群，##：$p < 0.05$ vs.高食塩群（Newman-Keuls 法）

Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-50369

腎障害バイオマーカー：4 週間反復経口投与後に尿中の腎障害バイオマーカーを測定した。腎障害分子-1（KIM-1）は，腎障害や虚血後に近位尿細管上皮細胞内で発現上昇する膜貫通型蛋白である。高食塩負荷の DSS ラットでは，正常食塩群と比較して尿中の KIM-1 は 5.6 倍に上昇した。高食塩負荷による KIM-1 の上昇は，LCZ を含むすべての群で有意に抑制され，その抑制率は 30%以上であった。また，LOS / HCTZ 群のみ，高食塩負荷による KIM-1 上昇は正常食塩群と同程度まで抑制された。

好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン（NGAL）は，急性腎障害及び腎疾患のマーカーである。高食塩負荷により尿中 NGAL 値は 4.3 倍に上昇した。この NGAL の上昇は，すべての群で正常食塩群と有意差のないレベルまで抑制された。

オステオポンチンは尿細管及び糸球体の両方の細胞に発現する糖蛋白であり，腎障害により発現上昇するバイオマーカーである。高食塩負荷により，尿中オステオポンチンは約 6.8 倍に上昇

した。高食塩負荷によるオステオポンチンの上昇は，LOS / HCTZ 群でのみ有意に抑制された（Table 2-4，[Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]）。

Table 2-4 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの腎障害バイオマーカーに対する作用

投与群	KIM-1	NGAL	オステオポンチン
正常食塩	18 ± 2 #	23 ± 2 #	15 ± 1 #
高食塩溶媒	100 ± 13 *	100 ± 20 *	100 ± 18 *
高食塩 LCZ	57 ± 7 * #	51 ± 6 #	60 ± 15
高食塩 LOS	58 ± 8 * #	54 ± 11 #	92 ± 22 *
高食塩 HCTZ	59 ± 10 * #	53 ± 16 #	71 ± 19 *
高食塩 LOS / HCTZ	32 ± 5 #	25 ± 5 #	35 ± 5 #

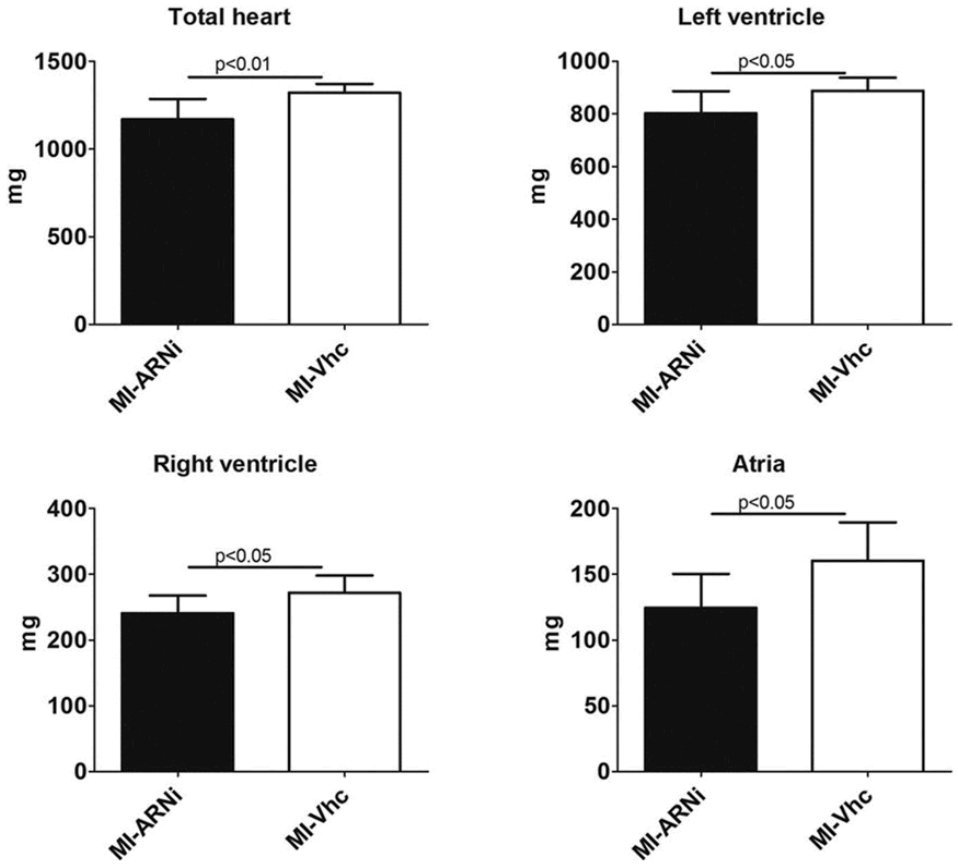
高食塩溶媒群の値を 100 としたときの各群の値を%で表す。値は平均値 ± 標準誤差を示す（各群 n = 12~16）。
: $p < 0.05$ vs.高食塩溶媒群，* : $p < 0.05$ vs.正常食塩群（Newman-Keuls 法）。
Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-50369

2.5.2 冠動脈結紮心筋梗塞モデルラットの心肥大に対する LCZ の作用

冠動脈結紮による心筋梗塞ラットは心不全のモデルとして広く用いられ，心不全治療薬の評価にしばしば用いられている。本モデルでは心筋梗塞により心機能不全を伴う心筋肥大，心室拡張等のリモデリングを引き起こす。

雄性 SD ラット（250 g）を用い，冠動脈結紮の 1 週間後から溶媒及び 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，心筋梗塞後の心リモデリングに対する作用を検討した（von Lueder et al. 2013）。LCZ 群では溶媒群と比べて，左心室，右心室，心房の各部位及び総心臓重量に有意な減少がみられ，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（Figure 2-11）。

Figure 2-11　冠動脈結紮心筋梗塞モデルラットにおける LCZ の心臓リモデリングに対する作用



雄性 SD ラットの冠動脈結紮の 1 週間後に無作為に群分けし LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）又は溶媒を 4 週間反復経口投与した。投与期間終了後に心臓を摘出し，左心室，右心室，心房の各重量を測定した。
MI-ARNi：LCZ 群（n = 11），MI-Vhc：溶媒群（n = 6）。値は平均値 ± 標準誤差を示す。
Source : von Lueder et al. 2013

2.5.3　高食塩負荷 DSS ラットの心肥大に対する VAL の作用

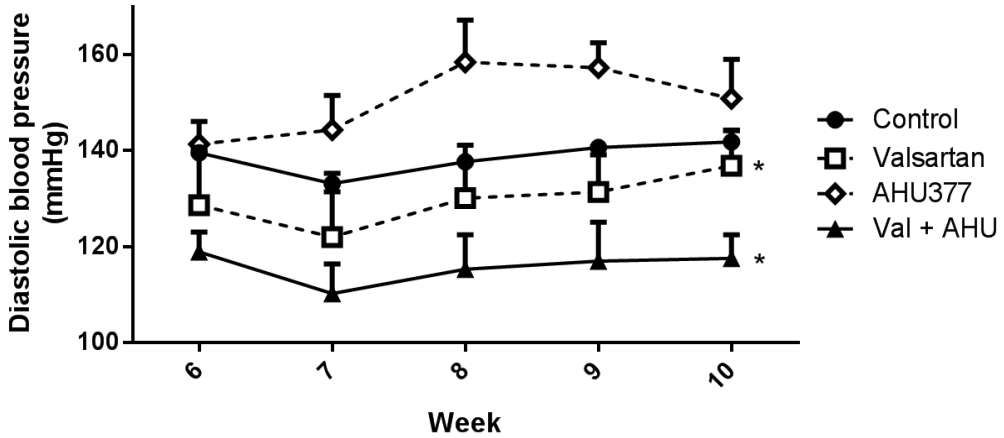
6 週齢の雄性 DSS ラットに 8%食塩食を与えると同時に VAL を 3 及び 10 mg/kg の用量で投与し（各群 8 及び 6 例），心肥大に対する作用を検討したところ，左室肥大に対して VAL の 3 及び 10 mg/kg で抑制効果が認められた（Yoshida et al. 2007）。一方，7 週齢の DSS ラット 10 例に 8%食塩食を与えて VAL（溶媒：0.5%CMC 液）の効果を検討したところ，心室肥大抑制は 30 mg/kg でみられたとの報告がある（Kim et al. 2001）。

2.5.4　脳卒中易発症性高血圧モデルラット SHRSP の血管リモデリング及び心筋線維化に対する VAL，AHU，及び VAL/AHU の作用

10 週齢の雄性 SHRSP に VAL 10 mg/kg，AHU 100 mg/kg，又は VAL / AHU 併用を 10 週間混餌投与した。正常血圧対照として Wistar-Kyoto ラットを用いた。

・**降圧作用**：投与開始前の収縮期血圧は最大 200 mmHg であった（テールカフ法）。投与期間の後半 4 週間（投与 6～10 週）の拡張期血圧（テレメトリー法）は，VAL / AHU 併用群において減少がみられた。VAL 又は AHU の単剤群では明らかな降圧作用はみられなかった（Figure 2-12, Pu et al. 2008）。

Figure 2-12　脳卒中易発症性高血圧モデルラットの拡張期血圧に対する VAL，AHU，及び 2 剤併用の作用

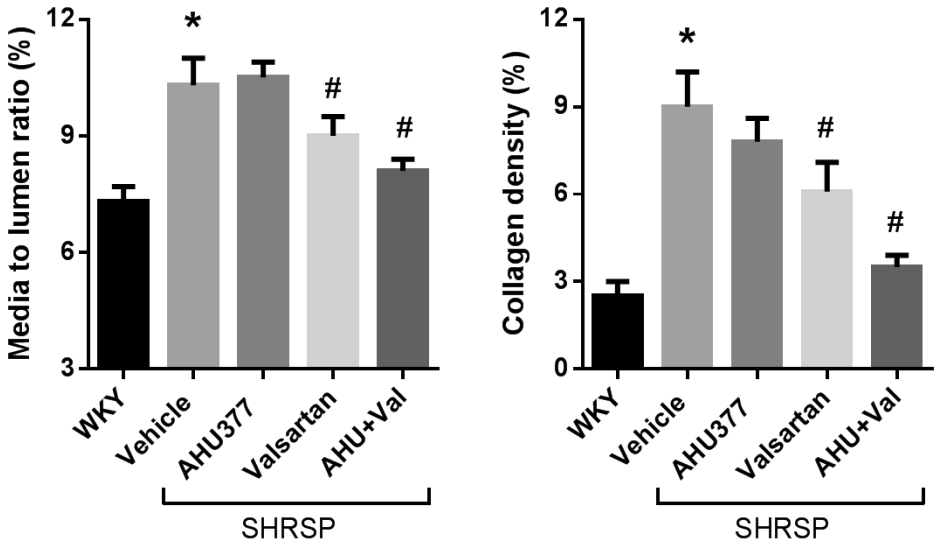


SHRSP に VAL，AHU，又は VAL / AHU（併用）を 10 週間混餌投与し，拡張期血圧をテレメトリー法で測定した。値は平均値 ± 標準誤差を示す（各群 n = 6）。*：$p < 0.01$ vs 対照群（Newman-Keuls 法）。

Source : Pu et al. 2008，図は改変して使用した。

・**血管リモデリング及び心筋線維化に対する作用**：SHRSP では Wistar-Kyoto ラットに比べて心筋内冠動脈の中膜/内腔比の増加及び血管周囲間質の線維化（コラーゲン密度増加）の増加がみられた。これらの変化に対して，AHU 群では影響はみられなかった。VAL 群では中膜/内腔比及び線維化の有意な減少が認められた。VAL / AHU 併用群でも両パラメータの有意な減少がみられ，その作用は VAL 単独群より強かった（Figure 2-13，Pu et al. 2008）。

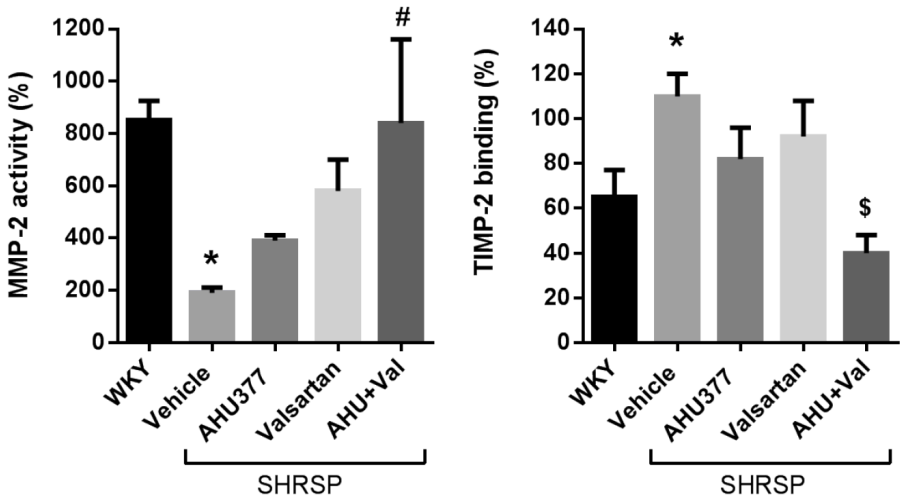
Figure 2-13　脳卒中易発症性高血圧モデルラットの心筋内冠動脈の中膜／内腔比及び血管周囲間質の線維化に対する VAL，AHU，及び 2 剤併用の作用



SHRSP に VAL，AHU，又は VAL / AHU（併用）を 10 週間混餌投与し，心筋内冠動脈の中膜 / 内腔比（左図）及び血管周囲間質の線維化（コラーゲン密度，右図）を測定した。値は平均値 ± 標準誤差を示す（各群 n = 6）。
*：$p < 0.05$ vs Wistar-Kyoto ラット（WKY）群，#：$p < 0.05$ vs SHRSP 対照群（Vehicle）（Newman-Keuls 法）。
Source : Pu et al. 2008，図は改変して使用した。

さらに，SHRSP では Wister-Kyoto ラットに比べて血管マトリックスメタロプロテアーゼ-2（MMP-2）活性の減少及び組織メタロプロテアーゼ阻害物質-2（TIMP-2）活性の増加がみられた。これらの変化に対して，AHU 及び VAL の単独群では影響はみられなかった。一方で，VAL と AHU の併用群では両パラメータの有意な改善が認められた（Figure 2-14）。心臓の病理組織学的検査では，SHRSP 対照群に比べてすべての群でマクロファージ浸潤の軽減がみられ，VAL と AHU の併用群では VAL 及び AHU 単独群に比べてより軽減されていた（Pu et al. 2008）。

Figure 2-14　脳卒中易発症性高血圧モデルラットの MMP-2 及び TIMP-2 に対する VAL，AHU，及び 2 剤併用の作用



SHRSP に VAL，AHU，又は VAL / AHU（併用）を 10 週間混餌投与し，大動脈の MMP-2 活性（左図）及び TIMP-2 結合能（右図）をゼラチンザイモグラフィーにより測定した。値は平均値 ± 標準誤差を示す（各群 n = 6）。*：$p < 0.05$ vs Wistar-Kyoto ラット（WKY）群；#，$：$p < 0.05$ vs SHRSP 対照群（Vehicle）（Newman-Keuls 法）。

Source : Pu et al. 2008，図は改変して使用した。

2.5.5　脳卒中易発症性高血圧モデルラット SHRSP の心肥大，腎障害，及び死亡に対する VAL の作用

8 週齢の雄性 SHRSP に溶媒（0.5% CMC 液）及び VAL の 3，10，及び 30 mg/kg を 48 週間反復経口投与した（溶媒群 30 例，VAL 群各 10 例）。溶媒群では，脳卒中，心臓及び大動脈の肥大，並びに腎障害の増加がみられ，30 例中 14 例の死亡が認められた。VAL 群では，脳卒中の発生率，心臓重量，大動脈の壁 / 内腔比，及び蛋白尿の減少並びに腎臓組織病理学的病変の軽減がいずれも用量依存的に示されており，死亡例は認められなかった。このような結果は，ENA の 1 及び 10 mg/kg を投与した場合も同様であった [Table 2.6.3.1-RD-1995-03259]。

2.5.6　冠動脈結紮心筋梗塞モデルラットの心負荷に対する VAL の作用

雄性 Wistar ラット（200～350 g）の冠動脈を結紮して作製した心筋梗塞モデルを用い，VAL の作用を経口投与又は皮下投与で検討した。また，比較対照に ENA 又は BEN を用いた。

経口投与の試験では，冠動脈結紮の翌日から溶媒（0.5% CMC 液）及び VAL の 10 及び 30 mg/kg を 4 週間反復経口投与した（各群 7 例）。ENA の 3 mg/kg も同様に投与した。溶媒群では，冠動脈結紮により左心室拡張末期圧の増加，心拍出量及び平均動脈圧の減少が認められた。VAL の 30 mg/kg 群では，溶媒群に比較して左心室拡張末期圧の低下及び左心室肥大の抑制がみられたが，心拍出量の改善又は平均動脈圧の変動は認められなかった。ENA 群では同様の変化は認められなかった [Table 2.6.3.1-PKF-95-03265]。

皮下投与の試験では，VAL の 1，3，10 mg/kg/日を冠動脈結紮直後（早期）から 21 日間及び冠動脈結紮 21 日後（後期）から 14 日間，それぞれ浸透圧ミニポンプを用いて皮下投与した（各群 6～9 例）。BEN の 3 mg/kg/日についても同様に投与した。VAL 群（1 mg/kg/日を除く）及び BEN 群の早期（1 mg/kg/日を除く）及び後期ともに平均動脈圧の低下が認められた。5-ブロモ-2-デオキシウリジン取り込みを指標に血管内皮細胞あるいは周囲組織の増殖能を検討したが，VAL 及び BEN ともに影響は認められなかった [Table 2.6.3.1-RD-1995-03294]。

2.5.7 高血圧モデルラットの血圧に対する LCZ，AHU，及び VAL の作用

LCZ の降圧作用について，病態生理学的背景の異なる数種の動物モデルを用いて評価した。dTGR では RAAS が高度に亢進し，急性高血圧を発症して成熟前に病的状態及び死亡に至る病態モデルである。DOCA 食塩高血圧ラットは，片腎摘出後に酢酸デオキシコルチコステロン（DOCA）の投与と高食塩負荷を行うことにより体液貯留に伴い高血圧を発症する。Dahl 食塩感受性（DSS）ラットではレニン活性が低く，腎臓におけるナトリウム排泄に障害があり，尿中ナトリウム排泄を維持するため体液貯留による代償性高血圧を呈するモデルである。高血圧自然発症ラット（SHR）は，dTGR と比べて中等度のレニン活性を示す食塩非感受性のモデルであり，加齢に伴い高血圧並びに心臓及び腎臓の病変が発現する。Table 2-5にこれらの高血圧モデルにおける LCZ，AHU，及び VAL の作用の要約を示す。

Table 2-5 高血圧モデルラットの血圧に対する LCZ，AHU，及び VAL の作用

モデル	投与量（例数）	試験番号	特記すべき所見
dTGR	溶媒: 空カプセル LCZ: 2, 6, 20, 60 mg/kg p.o. （各群 4～6 例）	[RD-2006-51202]	雄性 dTGR におけるベースライン時の平均動脈圧は 170～180 mmHg であった。LCZ をカプセルに充填し，雄性 dTGR に単回経口投与したとき，用量依存的かつ持続的な降圧作用が認められた。平均動脈圧のベースラインからの最大変化量の平均値は，溶媒群，LCZ の 2，6，20，及び 60 mg/kg 群で，それぞれ－21，－31，－52*，－57*，及び－73* mmHg であった（*：$p < 0.05$ vs. 溶媒群，Tukey 法）。また，LCZ の 60 mg/kg 群の降圧作用は，24 時間以上持続した。
DOCA ラット	溶媒: 3%コーンスターチ AHU: 30 mg/kg（遊離塩基換算量 28.5 mgEq/kg） p.o. （各群 6 例）	[RD-2002-50881]	雄性 DOCA 高食塩負荷ラット（308～380 g）において，AHU は中等度の平均動脈圧抑制（溶媒群に比べて最大 13 mmHg の抑制）を示したが，統計学的有意差はみられなかった。
DOCA ラット	溶媒: 5%アラビアガム溶液 VAL: 10, 30 mg/kg p.o. （各群 6 例）	[PKF-95-03268]	雄性 DOCA 高食塩負荷ラットにおいて，VAL は収縮期血圧に影響を及ぼさなかった。
DSS ラット	溶媒: 水 LCZ: 68 mg/kg（遊離塩基換算量	[RD-2011-50290]	7～8 週齢の雄性 DSS ラットに 8%食塩含有飼料を摂取させ，8 日後から被験物質を 2 週間経口投与した。この間，血圧をテレメトリー法で測定した。高食塩負荷 8 日後の平均動脈圧は負荷前に比べて 6 mmHg

モデル	投与量（例数）	試験番号	特記すべき所見
	60 mgEq/kg） p.o. VAL: *31 mg/kg p.o. （各群 5 例）		まで上昇した。溶媒群及び VAL 群では，2 週間投与後の平均動脈圧（24 時間の平均値）が投与開始時に比べて 35 及び 25 mmHg までそれぞれ上昇した。一方，LCZ 群での上昇は 15 mmHg であった。また，毎日の投与 7 時間後までの最大平均動脈圧については，溶媒群及び VAL 群では投与開始時に比べて変動はなかったが（それぞれ 2 及び－3 mmHg の変動），LCZ 群では投与開始時に比べて 13 mmHg 低下した。 これらの結果から，低レニン活性及び体液貯留依存の高血圧モデルでは，LCZ は VAL に比べてより高い降圧効果を示すことが示唆された。
SHR	溶媒: 水 LCZ: 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg） p.o. VAL: *31 mg/kg p.o. （各群 3 又は 5 例）	[RD-2011-50289]	42 週齢の雄性 SHR に被験物質を 2 週間経口投与し，血圧をテレメトリー法により測定した。LCZ 及び VAL 群ともに，平均動脈圧は有意に低下し，投与後 5 日までに最大の降圧作用が認められ，投与期間中に安定した降圧作用がみられた。LCZ 及び VAL の降圧作用の程度は同等であった。したがって，中等度のレニン活性を有し食塩非感受性の高血圧モデルでの作用は LCZ 及び VAL で同等であることが示唆された。
SHR	溶媒: 5%アラビアゴム溶液 VAL: 1, 3, 10, 30 mg/kg p.o. （各群 6 例）	[PKF-95-03268]	10 週齢の雄性 SHR に VAL を 28 日間経口投与し，収縮期血圧を尾プレチスモグラフィにより測定した。VAL 群では初回投与後に収縮期血圧の低下（最大 25 mmHg）がみられ，その程度は ENA 3 mg/kg 群と同等であった。VAL の降圧作用は反復投与により増強した（最大 31 mmHg）。

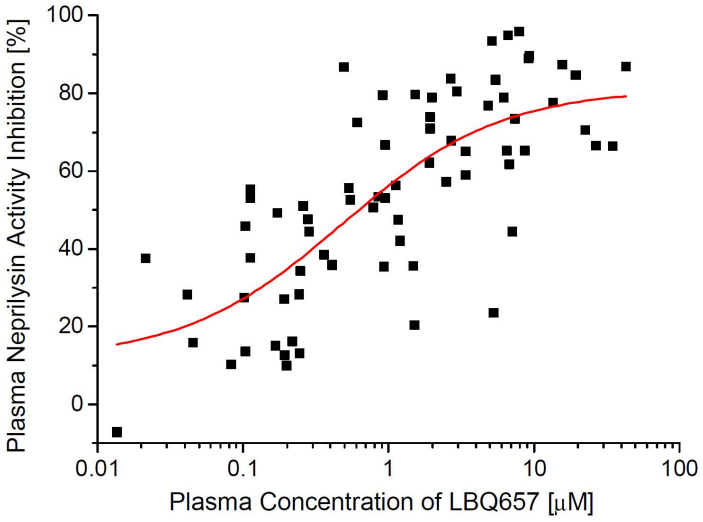
*：VAL 曝露量として LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）に相当

2.6 その他の薬理試験

2.6.1 薬物動態と薬力学の関連性

雄性カニクイザル 3 例に AHU（溶媒：0.5%メチルセルロース溶液）を単回経口投与したときの LBQ の血漿中濃度と NEP 阻害活性の相関性について検討した [Table 2.6.3.1-RD-2013-00171]。採血は，投与後 15 分から 24 時間の間で数回に分けて行い，各ポイントの LBQ の血漿中濃度及び NEP 酵素活性を測定した。LBQ の血漿中濃度は用量依存的であり，投与後 1.2～2 時間で最高値に到達した。AHU の 3，10，及び 30 mg/kg を単回経口投与したときの LBQ の Cmax は，それぞれ 6.1，9.6，及び 62.2 µM であった。AHU の 10 及び 30 mg/kg を単回経口投与したときの NEP 阻害活性は 79～85%であり，30 mg/kg ではその阻害作用が最大 5 時間持続した。LBQ の血漿中濃度と血漿中 NEP 阻害活性は相関しており，その IC_{50} 値は 0.5 µM であった（Figure 2-15）。

Figure 2-15　　カニクイザルにおける LBQ の血漿中濃度及び血漿中 NEP 阻害活性の相関



カニクイザルに AHU の 3，10，及び 30 mg/kg を単回経口投与し，血漿中 LBQ 濃度と NEP 阻害活性を測定した。NEP 阻害活性は投与前値（0%阻害）に対する阻害率（%）に換算し，対応する LBQ 濃度に対してプロットした。非線形ロジスティック回帰の結果，IC_{50} 値は 0.5 ± 0.3 µM，ヒル係数は 0.79 ± 0.41 であった（値は平均値 ± 標準偏差）。

Source : Table 2.6.3.1-RD-2013-00171

2.6.2　サロゲートマーカー

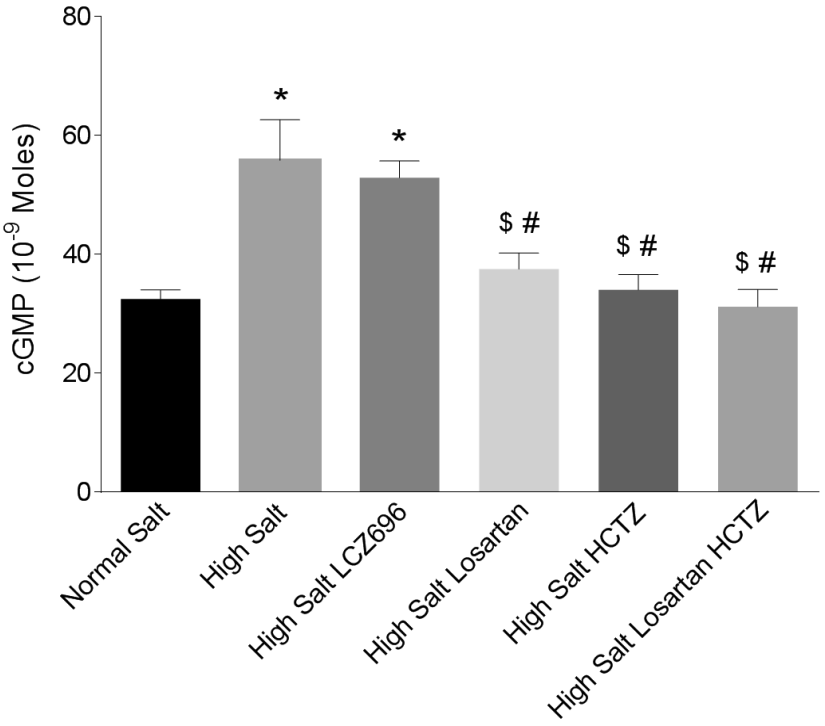
NP 系及び RAAS への影響を検討する目的で，それぞれのサロゲートマーカーである cGMP 及び血漿中 RAAS 構成因子をラット及びイヌで測定した。

2.6.2.1　高食塩負荷 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を 4 週間反復経口投与したときの尿中 cGMP に対する作用

高食塩負荷により高血圧を呈した 11 週齢の雄性 DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，又は LOS 及び HCTZ の 2 剤併用（以下 LOS / HCTZ）を 4 週間反復経口投与し，尿中 cGMP に対する影響を検討した [Table 2.6.3.1-RD-2013-50369]。給餌による高食塩食（4% NaCl 含有）負荷は投与 3 週間前から開始し，4 週間の反復投与中も継続した。正常対照群には，正常食塩食（0.49% NaCl 含有）を与えた。

尿中 cGMP：尿中 cGMP の生成量を指標として，本モデルにおける LCZ の NEP 阻害作用を検討した。被験物質初回投与日の投与直後から 24 時間にわたり尿を採取し，尿中の cGMP 量を測定した。高食塩群の尿中 cGMP 量は，正常食塩群と比べて 52%増加した。LCZ 群では，高食塩群と同様に尿中 cGMP 量の増加が維持されたが，LOS，HCTZ，又は LOS / HCTZ 群では，いずれも尿中 cGMP 量は高食塩群に比べて有意に低下した（Figure 2-16）。

Figure 2-16 DSS ラットに LCZ，LOS，HCTZ，及び LOS / HCTZ を経口投与したときの初回投与後 24 時間における尿中 cGMP



雄性 DSS ラットに正常食塩食（0.49% NaCl 含有）又は高食塩食（4% NaCl 含有）を 7 週間与えた。高食塩負荷開始 3 週間後（week 0）から DSS ラットに溶媒（コーンオイル），LCZ 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg），LOS 30 mg/kg，HCTZ 9.7 mg/kg，及び LOS / HCTZ 併用を投与し，投与直後から 24 時間にわたり尿を採取した。尿中 cGMP 濃度を測定し，尿量で補正した値を 24 時間あたりのモル数として示した。値は平均値 ± 標準誤差で示した（各群 n = 15~16）。

*：$p < 0.05$ vs.正常食塩群，#：$p < 0.05$ vs.高食塩群，$：$p < 0.05$ vs.高食塩 LCZ 群（Newman-Keuls 法）。

Source: Table2.6.3.1-RD-2013-50369，図は改変して使用した。

2.6.2.2 低ナトリウム食飼育ラットに VAL を単回経口投与したときの血漿中 RAAS 構成因子に対する作用

雄性 SD ラット（300 g）を低ナトリウム食で 2 週間飼育後，VAL の 10 mg/kg 又は溶媒（5%グルコース溶液）を単回経口投与し（VAL 群 6 例，溶媒群 20 例），血漿中の RAAS 構成因子（レニン，Ang II，及びアルドステロン）を評価した。なお，レニンについては血漿レニン活性（PRA）として評価した。VAL 群では，PRA 及び血漿中 Ang II の上昇がみられたが，アルドステロン濃度に変化はみられなかった。溶媒群ではこれらの因子に変動はみられなかった。また，低ナトリウム食飼育ラット及び無処置ラットに Ang II を静脈内投与して誘発したアルドステロン上昇に対して，VAL は抑制作用を示した [Table 2.6.3.1-RD-1991-03231]。

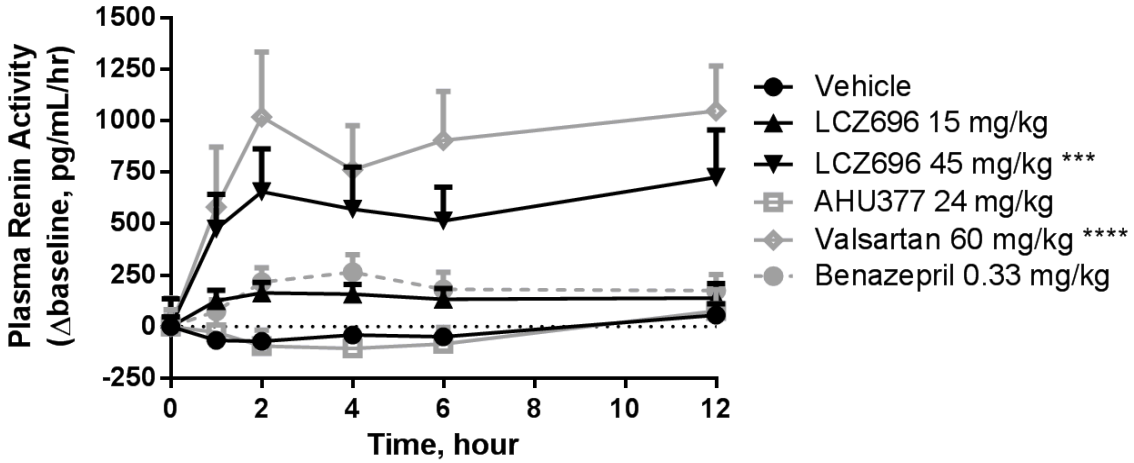
2.6.2.3 低ナトリウム食飼育イヌに LCZ，AHU，VAL，及び BEN を 10 日間反復経口投与したときの血漿中 RAAS 構成因子及び cGMP に対する作用

低ナトリウム食で飼育したビーグル犬 18 例（雌雄各 9 例）に，LCZ 15 及び 45 mg/kg（遊離塩基換算量 14 及び 42 mgEq/kg）又は溶媒（空カプセル）を 10 日間反復経口投与した。投与 1，5，及び 10 日目に 12 時間にわたって採血し，血漿中の RAAS 構成因子（レニン，Ang I，Ang II，アルドステロン，及びコルチゾール）及び cGMP レベルを評価した。なお，レニンについては PRA として評価した。比較対照薬として VAL 60 mg/kg，AHU 24 mg/kg（遊離塩基換算量 23 mgEq/kg），及び BEN 0.33 mg/kg（遊離塩基換算量 0.30 mgEq/kg）を用いた。いずれのマーカーも，投与 1，5，及び 10 日目に投与直前から投与後 12 時間まで経時的に測定し，3 日間の平均値で算出した。

PRA 及び Ang I

溶媒群及び AHU 群では PRA に影響は認められなかった。LCZ 45 mg/kg 群及び VAL 群では，いずれも PRA の有意な上昇がみられたが，投与後 2 時間の PRA は，VAL 群と比較して LCZ 45 mg/kg 群の方が低値であった。LCZ 15 mg/kg 群及び BEN 群でも，PRA の上昇がみられたが，溶媒群との間に有意差は認められなかった（Figure 2-17）。血漿中の Ang I 濃度についても，PRA と同様の結果であった。これらの結果から，LCZ は Ang II の AT_1 受容体を介したシグナル伝達を阻害し，レニン及び Ang I の発現を代償的に誘発することが示された [Table 2.6.3.1-CRA 11-014]。

Figure 2-17 PRA に対する LCZ，AHU，VAL，及び BEN の作用



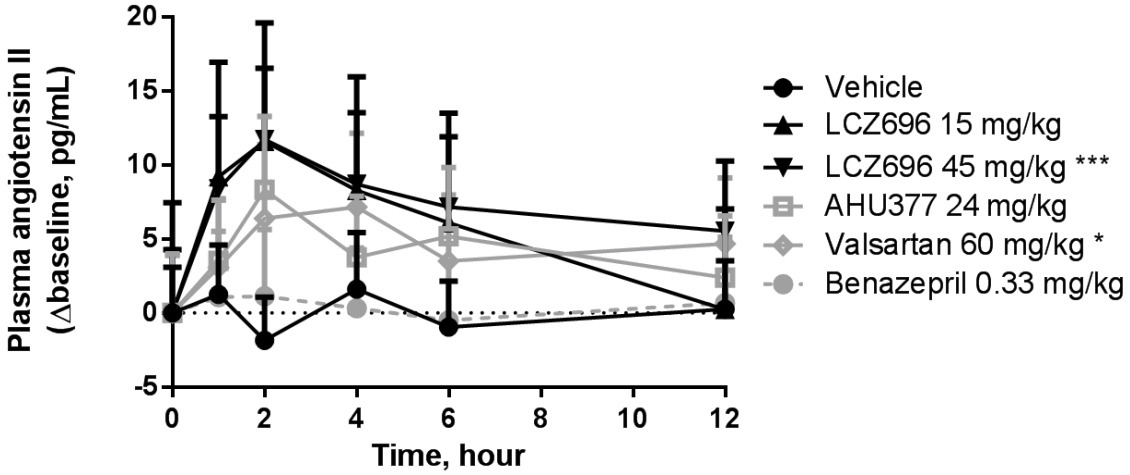
雌雄ビーグル犬に溶媒（空カプセル），LCZ 15 又は 45 mg/kg（遊離塩基換算量 14 又は 42 mgEq/kg），AHU 24 mg/kg（遊離塩基換算量 23 mgEq/kg），VAL 60 mg/kg，及び BEN 0.33 mg/kg（遊離塩基換算量 0.30 mgEq/kg）を 10 日間反復経口投与したときの投与後 12 時間までの PRA（pg/mL/h）の経時変化。値は投与 1，5，及び 10 日目の平均値 ± 標準誤差で示す。溶媒群，LCZ 45 mg/kg 群，及び VAL 群は n = 12，LCZ 15 mg/kg 群，AHU 群，及び BEN 群は n = 6。***：$p < 0.001$ vs.溶媒群，****：$p < 0.0001$ vs.溶媒群（一元配置分散分析による AUC の比較）。

Source : Table 2.6.3.1-CRA 11-014，図は改変して使用した。

Ang II

AHU 及び BEN 以外の群では，PRA 及び Ang I でみられたのと同様に血漿中 Ang II 濃度の上昇が認められた。AHU 群では PRA 及び Ang I 濃度に影響はみられなかったが，投与後 2 時間では Ang II 濃度の有意な上昇が認められた。Ang II は NEP により分解されることから，AHU 群での Ang II の上昇は，AHU の活性代謝物である LBQ の NEP 阻害により血漿中 Ang II の分解が抑制されたためと考えられる。一方で，BEN 群は PRA 及び血漿中 Ang I 濃度をわずかに上昇させたが，血漿中 Ang II 濃度には影響を及ぼさなかった（Figure 2-18）。これは，BEN のアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害により Ang II の産生が抑制されたためと考えられる [Table 2.6.3.1-CRA 11-014]。

Figure 2-18　　血漿中 Ang II に対する LCZ，AHU，VAL，及び BEN の作用



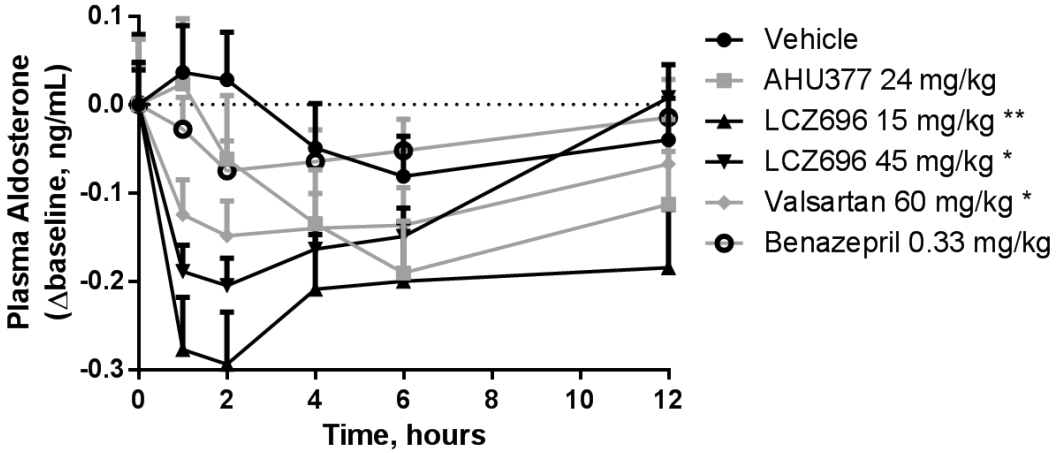
雌雄ビーグル犬に溶媒（空カプセル），LCZ 15 又は 45 mg/kg（遊離塩基換算量 14 又は 42 mgEq/kg），AHU 24 mg/kg（遊離塩基換算量 23 mgEq/kg），VAL 60 mg/kg，及び BEN 0.33 mg/kg（遊離塩基換算量 0.30 mgEq/kg）を 10 日間反復経口投与したときの投与後 12 時間までの血漿中 Ang II 濃度（pg/mL）の経時変化。値は投与 1，5，及び 10 日目の平均値 ± 標準誤差で示す。溶媒群，LCZ 45 mg/kg 群，及び VAL 群は n = 12，LCZ 15 mg/kg 群，AHU 群，及び BEN 群は n = 6。*：$p < 0.05$，***：$p < 0.001$ vs.溶媒群（一元配置分散分析による AUC の比較）。
Source : Table 2.6.3.1-CRA 11-014，図は改変して使用した。

アルドステロン及びコルチゾール

溶媒投与により，血漿中アルドステロンはベースラインから平均（投与直後から 12 時間後までの平均変化量）で 0.006 ng·hr/mL 低下したものの，投与前値と比較して有意な影響は認められなかった。AHU 及び BEN 群では血漿中アルドステロンの低下傾向がみられた（ベースラインからの低下：0.090 及び 0.079 ng·hr/mL，$p < 0.08$ vs.溶媒群）。LCZ 15 mg/kg，LCZ 45 mg/kg，及び VAL は，血漿中アルドステロンを有意に低下させた（ベースラインからの低下：0.228，0.142，及び 0.126 ng·hr/mL）。LCZ 15 mg/kg 群では投与後 2 時間で最大の低下が認められ（$p < 0.05$ vs. 溶媒群），その低下作用は VAL と比較して 2 倍以上であった（Figure 2-19，[Table 2.6.3.1-CRA 11-014]）。

血漿中コルチゾールには被験物質投与による変動は認められなかった [Table 2.6.3.1-CRA 11-014]。

Figure 2-19　　血漿中アルドステロンに対する LCZ，AHU，VAL，及び BEN の作用



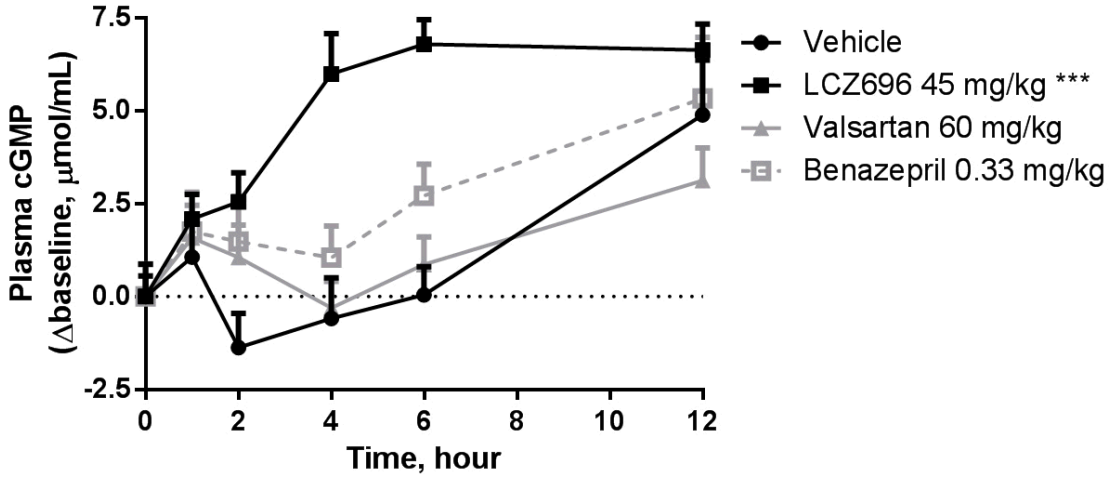
雌雄ビーグル犬に溶媒（空カプセル），LCZ 15 又は 45 mg/kg（遊離塩基換算量 14 又は 42 mgEq/kg），AHU 24 mg/kg（遊離塩基換算量 23 mgEq/kg），VAL 60 mg/kg，及び BEN 0.33 mg/kg（遊離塩基換算量 0.30 mgEq/kg）を 10 日間反復経口投与したときの投与後 12 時間までの血漿中アルドステロン濃度（ng/mL）の経時変化。値は投与 1，5，及び 10 日目の平均値 ± 標準誤差で示す。溶媒群，LCZ 45 mg/kg 群，及び VAL 群は n = 12，LCZ 15 mg/kg 群，AHU 群，及び BEN 群は n = 6。*： $p < 0.05$ vs.溶媒群，**： $p < 0.01$ vs.溶媒群（一元配置分散分析による AUC の比較）。

Source : Table 2.6.3.1-CRA 11-014，図は改変して使用した。

cGMP

すべての群において，血漿中 cGMP 濃度はベースラインから有意に上昇した（$p < 0.05$，ベースラインとの比較）。LCZ 45 mg/kg 群では，投与後 12 時間にわたる血漿中 cGMP 濃度の上昇が認められており，血漿中 cGMP の AUC は溶媒群と比較して有意に増加した（増加率：約 180%）。一方で，VAL 及び BEN 群では，溶媒群との比較で，血漿中 cGMP 濃度に変化はみられなかった（Figure 2-20，[Table 2.6.3.1-CRA 11-014]）。

Figure 2-20　　血漿中 cGMP に対する LCZ，VAL，及び BEN の作用



雌雄ビーグル犬に溶媒（空カプセル），LCZ 45 mg/kg（遊離塩基換算量 42 mgEq/kg），VAL 60 mg/kg，及び BEN 0.33 mg/kg（遊離塩基換算量 0.30 mgEq/kg）を 10 日間反復経口投与したときの投与後 12 時間までの血漿中 cGMP 濃度（µmol/mL）の経時変化。値は投与 1，5，及び 10 日目の平均値 ± 標準誤差で示す。LCZ 45 mg/kg 群及び VAL 群は n = 12，溶媒群及び BEN 群は n = 6。***： $p < 0.0001$ vs.溶媒群（一元配置分散分析による AUC の比較）。

Source : Table 2.6.3.1-CRA 11-014，図は改変して使用した。

2.6.2.4　急速心室ペーシング法による心不全モデルイヌに VAL を 2 週間反復経口投与したときの血漿中 RAAS 構成因子及び ANP に対する作用

雄性成熟ビーグル犬に急速心室ペーシングを 2 週間処置し，心不全を誘発させた。これらのイヌに VAL の 30 及び 100 mg/kg 又は溶媒（ゼラチンカプセル）を 2 週間反復経口投与し（VAL 群各 4 例，溶媒群 5 例），血漿中 RAAS 構成因子（レニン，Ang II，及びアルドステロン），ANP，及びノルアドレナリンを評価した。なお，レニンについては PRA として評価した。溶媒群では Ang II の増加及び ANP の増加傾向がみられたが，PRA 及びアルドステロンの変動はみられなかった。VAL 100 mg/kg 群では，2 週間反復投与後に PRA 及び Ang II が投与前値に比べて有意に増加した。アルドステロン，ANP，及びノルアドレナリンには変化はみられなかった [Table 2.6.3.1-PKF-95-03263]。

2.7　　作用機序

LCZ は NP の有益な作用を増強し，Ang II の心血管及び腎臓に対する有害作用を抑制することで効力を発揮すると考えられる。

NP 系は RAAS 及び交感神経系とともに血管緊張，体液・電解質バランス，及び心血管恒常性を制御する重要な内分泌系である。NP はペプチドホルモンであり，ANP，脳性 NP（BNP），C 型 NP（CNP）からなるファミリーを形成している。ANP 及び BNP は主に心筋障害時に心臓で産生され循環血液中に分泌される。一方，CNP は血管内皮細胞及び腎尿細管上皮細胞で産生され，

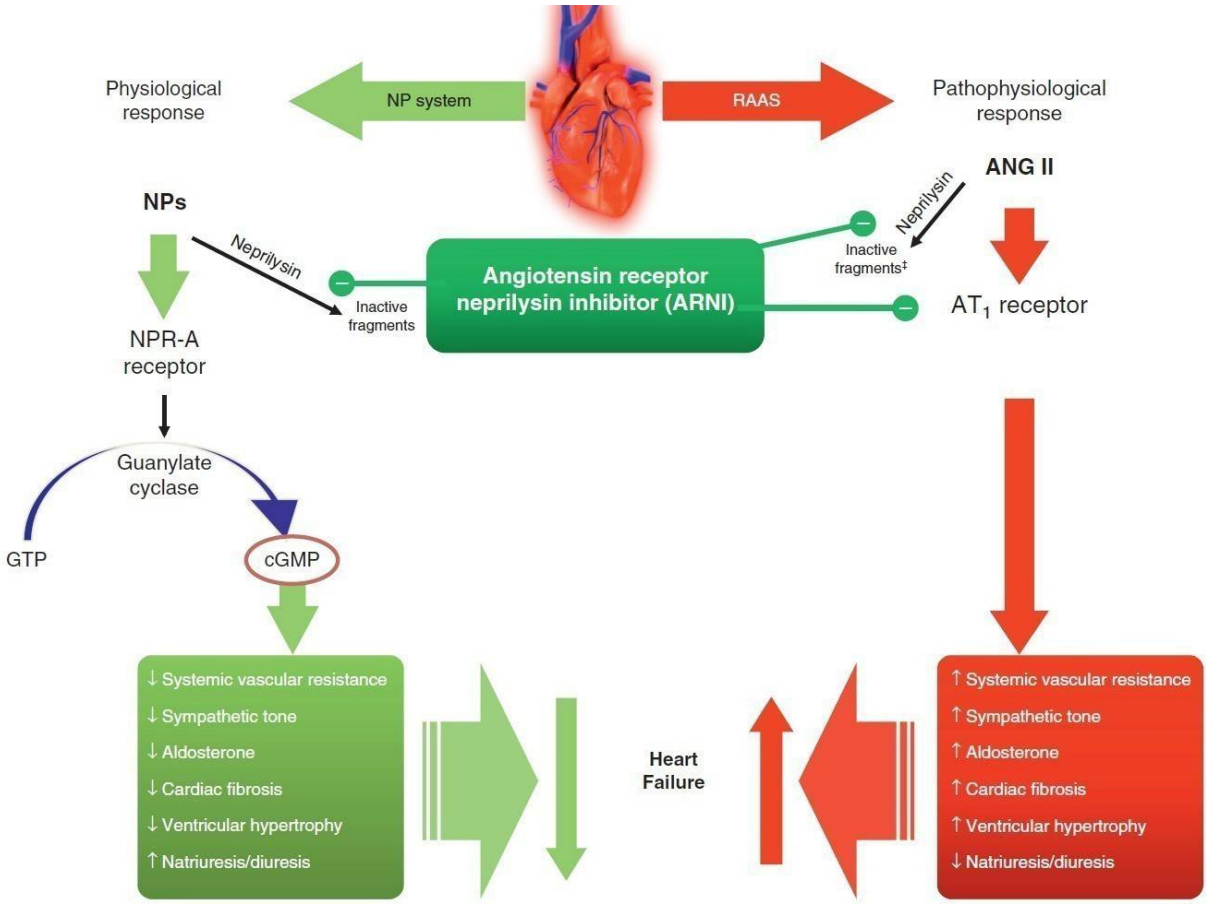
傍分泌により局所に作用する。NP は NEP 依存性の蛋白分解及びクリアランス受容体（NPR-C）により代謝される。LCZ は NEP 依存性分解を抑制することで NP 濃度を増加させる。

NP は膜結合型のグアニルシクラーゼドメインを有する NP 受容体（NPR-A，NPR-B）に結合し，NEP 阻害のバイオマーカーである cGMP の濃度を増加させる。NP は，血圧低下，血管拡張，ナトリウム利尿，利尿，糸球体ろ過及び腎血流の増加，レニン及びアルドステロンの分泌抑制，交感神経抑制作用，抗肥大作用及び抗線維化作用等，心血管及び腎臓に対する有益な作用に広く関与する（Kuhn 2009，Potter et al. 2009，Porzionato et al. 2010，de Bold 2011，Kishimoto et al. 2011）。LBQ の NEP 阻害作用により NP の分解が抑制されることで NP 濃度が上昇し，その効果の持続が心不全患者に対して有益な影響を与えると考えられる。

Ang II 及びアルドステロンは RAAS の主要なホルモンであり，血管収縮，腎臓でのナトリウム及び体液の貯留に関与し，血圧及び体液の増加，血管及び心筋細胞の肥大・増殖，並びに心血管系のリモデリングを引き起こす（Weir and Dzau 1999，Mehta and Griendling 2007）。LCZ から解離した VAL は，血管，心臓，腎臓，副腎等多くの組織において Ang II と AT_1 受容体の結合を選択的に拮抗することで RAAS を阻害する。また，LCZ は NP によるレニン及びアルドステロン分泌抑制を介して RAAS 阻害作用を発現する。さらに，AT_1 受容体拮抗と NEP 阻害の協同作用により，NEP 依存の Ang II 分解抑制に基づく有害作用を減弱させることが考えられる（Figure 2-21）。

結論として，LCZ は NP 系の内因性保護作用と RAAS の活性化による臓器障害の抑制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。

Figure 2-21 LCZ による NP 系及び RAAS の調節機構



Source : Langenickel and Dole 2012

3 副次的薬理試験

3.1 *In vitro* 薬理試験

AHU，LBQ，VAL 並びに対照薬であるエナラプリラト，チオルファン，及びオマパトリラトを用いて，NP やその他の基質の分解に関わる 10 種類のプロテアーゼに対する阻害作用を評価した [Table 2.6.3.3-RD-2013-00079]，[Table 2.6.3.3-RD-2005-50314]，[Table 2.6.3.3-RD-2005-50318]。

10 種類のプロテアーゼのうち，エンドセリン変換酵素（ECE）-1 及び ECE-2 は NEP と同じく Zinc メタロプロテアーゼ M13 ファミリーの一員であるが，LBQ の ECE-1 及び ECE-2 に対する阻害作用は弱く，それぞれの IC_{50} 値は 100 µM 以上及び 5.5 µM であった。さらに，LBQ は，インスリン分解酵素（IDE），アミノペプチダーゼ N（APN），アミノペプチダーゼ P2（APP-2），メプリン（meprin）-α，meprin-β，及びジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）に対して，IC_{50} 値は 100 µM 以上であった。

AHU 及び VAL は，いずれの酵素に対しても IC_{50} 値は 100 µM 以上であった。

ACE 阻害剤であるエナラプリラト（ENA の活性本体）は強力に ACE を阻害（IC_{50} 値：0.3 nM）し，ACE 以外の酵素に対して IC_{50} 値は 100 µM 以上であった。チオルファン及びオマパトリラトも ACE を阻害（IC_{50} 値：3.5 µM 及び 1.4 nM）し，オマパトリラトでは APP-2 に対して軽度の阻害作用（IC_{50} 値：600 nM）がみられた（Table 3-1）。

Table 3-1 LBQ，AHU，VAL，及び対照薬であるエナラプリラト，チオルファン並びにオマパトリラトの *in vitro* 酵素阻害活性（IC_{50} 値，microM）

酵素	LBQ	AHU	VAL	エナラプリラト	チオルファン	オマパトリラト
NEP-2	84.7 ± 2.8	> 100	> 100	> 100	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.3
ACE	> 100	> 100	> 100	0.0003 ± 0.00003	3.5 ± 0.8	0.0014 ± 0.0005
ECE-1	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
ECE-2	5.5 ± 0.6	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
IDE	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
APN	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
APP-2	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	0.6 ± 0.1
Meprin-α	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Meprin-β	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
DPP-4	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

値は 4 回以上の測定値の平均値 ± 標準偏差で示す。

Source : Table 2.6.3.3-RD-2013-00079，Table 2.6.3.3-RD-2005-50314，Table 2.6.3.3-RD-2005-50318

さらに G 蛋白質共役型受容体（GPCR），トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体，及び酵素を含む機能蛋白に対する AHU，LBQ，及び VAL の作用（阻害又は活性化）を評価した。

AHU は，57 種類の標的蛋白のうちコレシストキニン（CCK）a 受容体に対してのみ 30 µM で 50%を上回る阻害作用を示し（IC_{50} 値：15.5 µM，n = 2），CCKa 受容体発現細胞を用いた機能評価では 30 µM の濃度で 21%の阻害作用がみられた [Table 2.6.3.3-RD-2012-50571]。その他 62 種類のキナーゼに対して IC_{50} 値は 30 µM 以上であった [Table 2.6.3.3-RD-2013-00245]。

LBQ は 129 種類の標的蛋白に対して，IC_{50} 値は 10 あるいは 30 µM 以上であった [Table 2.6.3.3-RD-2012-50566]。キナーゼ阻害作用の検討では，62 種類のうち MAP4K4（mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4）に対してのみ弱い阻害作用（IC_{50} 値：> 22 µM）を示したが，その他のキナーゼに対して IC_{50} 値は 30 µM 以上であった [Table 2.6.3.3-RD-2013-00246]。

VAL は 81 種類の標的蛋白のうち，主薬効の標的である AT_1 受容体（Ki 値：2.3 nM）を除いていずれも IC_{50} 値は 10 µM 以上であった [Table 2.6.3.3-RD-2014-00323]。また，13 種類の神経伝達物質及び L 型カルシウムチャネルに対して，10 µM の濃度で 20%を上回る作用を示さなかった [Table 2.6.3.3-PKF-90-02611]。

3.2 *In vivo* 薬理試験

ブラジキニン（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，APP，NEP，DPP-4，及びキニ

ナーゼ 1 といった酵素も BK を切断するペプチダーゼであることが知られている。ブラジキニン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発現機序と考えられている。AHU 単独又は AHU と VAL の併用でのブラジキニンの生体作用に対する増強の有無を検討した。また，マーモセットにみられた VAL の腎病変の発現機序検討の一環として，VAL のマーモセット血圧に対する影響を検討した。

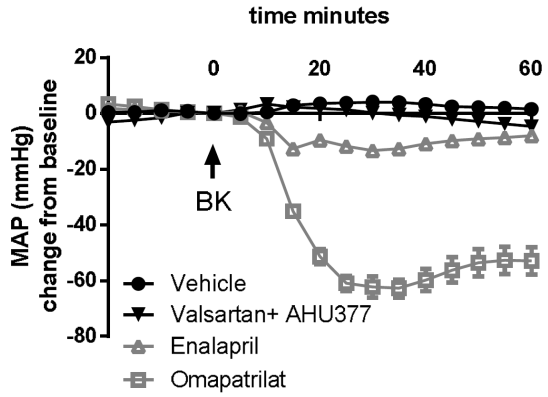
3.2.1 ブラジキニン誘発足浮腫に対する影響

雄性 SD ラットを用いて作製したブラジキニン誘発ラット足浮腫モデルを用いて，溶媒（3%コーンスターチ），AHU（100 mg/kg，経口），VAL（30 mg/kg，経口），及びこれら 2 剤併用時の影響を評価した（各群 4 例）。単独あるいは併用投与のいずれの群においても，溶媒群との比較で，ブラジキニン誘発足浮腫が増強されることはなかった [Table 2.6.3.3-RD-2005-50363]。一方で ENA 及びオマパトリラトは，このモデルにおいてブラジキニン誘発反応を増強した [Table 2.6.3.3-RD-2005-50307]。

3.2.2 ブラジキニン持続注入に対する血圧反応の増強作用

麻酔下において雄性 SD ラット（300～400 g）の左大腿動脈に圧トランスデューサーを挿入し，ブラジキニン静注時の血圧反応（平均動脈圧の変化）に対する溶媒（3%コーンスターチ），VAL 及び AHU の併用，ENA，並びにオマパトリラトの影響を検討した [Table 2.6.3.1-RD-2005-50365]，[Table 2.6.3.1-RD-2005-50366]。その結果，AHU 100 mg/kg（遊離塩基換算量 95 mgEq/kg）及び VAL 30 mg/kg の併用による十二指腸内投与は，ブラジキニン静注時の血圧反応に影響を及ぼさなかった。一方，ENA 又はオマパトリラト群では，ブラジキニン注入中，有意な降圧作用が誘発された（Figure 3-1）。

Figure 3-1 ブラジキニン持続注入に対する血圧反応の増強作用



ラットに，溶媒（n = 8），VAL 30 mg/kg 及び AHU 100 mg/kg（遊離塩基換算量 95 mgEq/kg）の併用（n = 4），ENA 30 mg/kg（n = 21），及びオマパトリラト 30 mg/kg（n = 13）を十二指腸内投与した。投与後 90 分にブラジキニンの持続静注（20 µL/min，1 µg/kg/min）を開始し，静注開始後 60 分まで血圧を測定した。値はベースラインからの平均動脈圧（MAP）の経時変化を示す（平均値 ± 標準誤差）。VAL 及び AHU 併用群の AUC には溶媒群と差がみられなかった。一方，ENA 及びオマパトリラト群では，溶媒群との比較で AUC の有意な減少がみられた（$p < 0.05$ vs.溶媒群，Tukey 法）。

Source : Table 2.6.3.3-RD-2005-50365，Table 2.6.3.3-RD-2005-50366，図は改変して使用した。

3.2.3 マーモセットにおける VAL の血圧に対する作用

2～8 歳齢の雌雄マーモセット（正常血圧）に溶媒（0.5%Tween80 を含む 0.5% CMC 液）又は VAL の 60，120，及び 200 mg/kg を 4 週間反復経口投与し，テレメトリー法で血圧を測定した（各群 5～7 例）。マーモセットの毒性試験では，VAL の 200 mg/kg/日以上で腎病変がみられたため，最高用量を 200 mg/kg とした。その結果，VAL 群では，収縮期及び拡張期血圧の用量依存的な低下が認められた。毒性変化はいずれの用量においてもみられなかった。200 mg/kg 群では，昼夜を通して収縮期／拡張期血圧の低下が認められたことから，マーモセットの腎病変の発現には血圧低下に伴う腎血流の低下が関与する可能性が示唆された [Table 2.6.3.3-PKF-95-03258]。

4 安全性薬理試験

主要な生命維持器官系に対する LCZ の影響を評価するため，安全性薬理試験を実施した。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。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。LBQ の安全性薬理試験として，*in vitro* 電気生理学的試験を実施した。主要な安全性薬理試験は ICH ガイドライン S7A 及び S7B に従い，GLP に準拠して実施した。

4.1 心血管系

4.1.1 LCZ の *in vitro* 電気生理学的試験

In vitro 電気生理学的試験 [Table 2.6.3.4-0670356] により，HEK293 細胞に発現させた hERG チャネル電流に及ぼす LCZ の影響を GLP 非適用で検討した。LCZ の適用濃度は 10，100，787 及び 3000 μM とし，パッチクランプ法により hERG 電流を測定した。

LCZ による hERG 電流の阻害率は 10 μM では 1.8%，100 μM では 1.7%，787 μM では 2.9%，3000 μM では 32.4%であったのに対して，溶媒投与では 0.7%であった。LCZ の hERG カリウム電流阻害作用に関する IC_{50} を算出することはできなかったが，3000 μM を超えると推定された。

なお，陽性対照薬であるテルフェナジンでは，60 nM の適用による hERG 電流阻害率は 78.8%であった。

4.1.2 LCZ のサルを用いたテレメトリー試験

サルを用いた心血管系に関するテレメトリー試験 [Table2.6.3.4-0670360] により，LCZ の血行動態及び心電図パラメータに対する影響を GLP 適用で検討した。本試験では，3 例のカニクイザルに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を，0，25 及び 100 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与はクロスオーバーデザインで行い，各用量間に 7 日間の休薬期間を設けた。投与前，並びに投与の

約 30 分，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10 及び 11 時間後に検査を行い，一般状態，動脈血圧（平均動脈圧，収縮期及び拡張期血圧，脈圧），心拍数及び心電図間隔（PR，RR，QRS，QT，QTc 及び ST 間隔），並びに心電図の定性的波形について評価した。

本試験では，LCZ 投与に関連した死亡及び一般状態の変化は認められなかった。25 mg/kg 群では，血行動態及び心電図パラメータに LCZ 投与の影響は認められなかった。100 mg/kg 群では，心拍数，脈圧，心電図間隔及び波形に異常は認められなかった。平均動脈圧，収縮期血圧及び拡張期血圧のわずかな低下が投与 6 時間後以降にみられたが，いずれも投与 18 時間後までに回復が認められた。

4.1.3 AHU の *in vitro* 電気生理学的試験

In vitro 電気生理学的試験 [Table2.6.3.4-0359201] により，HEK293 細胞に発現させた hERG チャネル電流に及ぼす AHU の影響を GLP 非適用で検討した。AHU の溶解性により適用最高濃度は 1 mM までとし，パッチクランプ法により hERG 電流を測定した。

最高濃度においても AHU による hERG 電流の阻害は認められなかった。

なお，陽性対照薬である E-4031 では，100 nM の適用による hERG 電流阻害率は 92.8%であった。

4.1.4 AHU のイヌを用いたテレメトリー試験

イヌを用いた心血管系に関するテレメトリー試験 [Table 2.6.3.4-0470026] により，AHU の血行動態及び心電図パラメータに対する影響を GLP 適用で検討した。本試験では，4 例の雌ビーグル犬に，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を，0，50 及び 250 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与は漸増法により行い，試験 1，4，8 日に各用量を投与した。また，別の雌 1 例には精製水を同様に投与し，対照とした。投与前，並びに投与の 0.25，0.5，1，2 及び 4 時間後に検査を行い，動脈血圧（平均動脈圧，収縮期及び拡張期血圧），心拍数，心電図及び体温について評価した。

本試験では，AHU 投与に関連した血圧，心拍数及び体温の変化はみられず，心電図の異常も認められなかった。

4.1.5 LBQ の *in vitro* 電気生理学的試験

In vitro 電気生理学的試験 [Table 2.6.3.4-1570187] により，HEK293 細胞に発現させた hERG チャネル電流に及ぼす LBQ の影響を GLP 適用で検討した。LBQ の適用濃度は 100，300 及び 1000 μM とし，パッチクランプ法により hERG 電流を測定した。

LBQ による hERG 電流の阻害率は 100 μM では 1.1%，300 μM では 4.9%，1000 μM では 6.7%であったのに対して，溶媒投与では 2.8%であり，1000 μM では統計学的有意差（$p < 0.05$）が認められた。LBQ の hERG カリウム電流阻害作用に関する IC_{50} を算出することはできなかったが，1000 μM 超と推定された。

なお，陽性対照薬であるテルフェナジンでは，60 nM の適用による hERG 電流阻害率は 82.0%であった。

4.2 呼吸系

4.2.1 LCZ のラットを用いた呼吸系に関する試験

ラットを用いた呼吸系に関する試験 [Table 2.6.3.4-0670393] により，LCZ の呼吸系に対する影響を GLP 適用で検討した。本試験では，1 群 6 例の Wistar 系雄ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を，0，200 及び 600 mg/kg の用量で単回経口投与した。ヘッドアウト型プレチスモグラフィーチャンバーを用いて，投与前及び投与約 1，2，4，24 時間後に呼吸パラメータ（1 回換気量，呼吸数及び分時換気量）を測定した。

本試験では，死亡及び LCZ 投与に関連した一般状態の変化はみられず，呼吸機能の変化も認められなかった。

4.2.2 AHU のラットを用いた呼吸系に関する試験

ラットを用いた呼吸系に関する試験 [Table 2.6.3.4-0480095] により，AHU の呼吸系に対する影響を GLP 適用で検討した。本試験では，1 群 6 例の Wistar 系雄ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を，0，250，1000 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与した。ヘッドアウト型プレチスモグラフィーを用いて，投与前及び投与約 1，2，6，24 時間後に呼吸パラメータ（1 回換気量，呼吸数及び分時換気量）を測定した。

本試験では，死亡及び AHU 投与に関連した一般状態の変化はみられず，呼吸機能の変化も認められなかった。

4.3 中枢神経系

4.3.1 LCZ の中枢神経系に関する試験

ラットを用いた中枢神経系に関する試験 [Table 2.6.3.4-0670464] により，LCZ の中枢神経系に対する影響を GLP 適用で検討した。本試験では，1 群 10 例の Wistar 系雄ラットに，0.5% CMC 懸濁液に懸濁した LCZ を，0，200 及び 600 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与約 15，30，45 分後及び 1，2，3，4，24 時間後にラットを観察し，神経薬理学的作用及び毒性学的作用について評価した。また，投与 60 分後に全例の直腸体温を測定した。

投与 4 時間後に 600 mg/kg 群で糞排泄量の減少がみられたことを除いて，いずれの動物においても，LCZ の神経薬理学的作用及び毒性学的作用を示唆する明らかな変化は認められなかった。いずれの動物においても，体温の変化は認められなかった。

4.3.2 AHU の中枢神経系に関する試験

マウスを用いた中枢神経系に関する試験 [Table2.6.3.4-0470089] により，AHU の中枢神経系に対する影響を GLP 適用で検討した。本試験では，1 群 10 例（対照群は 5 例）の ICR 系雄マウスに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を，0 及び 2000 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与約 15 分後及び 1，2，6，24 時間後にマウスを観察し，神経薬理学的作用及び毒性学的作用について評価した。また，投与前及び投与 1 時間後に全例の体温を測定した。

本試験では，AHU 投与に関連した神経薬理学的作用及び体温変化はみられず，一般状態の変化も認められなかった。

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

6 考察及び結論

6.1 考察

In vitro 及び *in vivo* の薬理試験から，以下のことが示された。

NEP 阻害作用及び AT_1 受容体拮抗作用

ラットに AHU を 30 mg/kg（遊離塩基換算量 28.5 mgEq/kg）の用量で単回経口投与したとき，腎皮質の NEP 活性が 73%阻害された。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 ANP 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。VAL は AT_1 受容体の競合的拮抗薬であり，Ang II を介したラット大動脈平滑筋細胞膜への結合を Ki 値 2.38 nM で阻害した（Criscione et al. 1993）。AT_1 受容体は，主に脳，副腎，心臓，血管，及び腎臓に発現しており，血圧及び電解質バランスの調節に関与する。ラットに VAL 10 mg/kg を単回経口投与したところ，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）。

LCZ による NP 系及び RAAS への作用

高食塩を負荷した DSS ラットでは尿中 cGMP 値の上昇がみられ，LCZ を 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）の用量で投与したときもその上昇は維持された。LCZ 投与後の cGMP 値の上昇維持は，循環血中の ANP 上昇及び NPR-A を介したグアニル酸シクラーゼの活性亢進によるものと考えられた。一方，HCTZ 及び LOS / HCTZ 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。

LCZ を低ナトリウム食飼育イヌに投与したとき，LCZ による RAAS 構成因子への影響として，AT_1受容体拮抗作用とともに NEP 阻害の関与が認められた。ここでは，用量設定によりカプセル剤で VAL 60 mg/kg を投与したときと同じ曝露量を示す LCZ 45 mg/kg（遊離塩基換算量 42 mgEq/kg）を検討した。

- LCZ 45 mg/kg（遊離塩基換算量 42 mgEq/kg）の投与は PRA 及び血漿中 Ang I 値をともに上昇させたが，PRA 上昇作用は VAL 60 mg/kg 投与に比べて弱かった。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）投与後 2 時間の血漿中 Ang II は，VAL 60 mg/kg と比較して上昇した。LCZ による Ang II 上昇は，AT_1受容体拮抗作用による正のフィードバックと NEP 阻害を介した Ang II の分解抑制によるものと考えられる。この知見から，降圧作用を期待して NEP を阻害する場合，AT_1受容体拮抗作用が必要と考えられる。
- 血漿アルドステロンの低下は，RAAS 阻害のひとつの指標であるが，LCZ 45 mg/kg（遊離塩基換算量 42 mgEq/kg）は，VAL 60 mg/kg 単独投与を上回るアルドステロン分泌抑制作用を示した。これは，LCZ 投与時の NEP 阻害による NP を介したアルドステロン産生低下（プロテインキナーゼ G 及びカルモジュリン依存的経路）及び Ang II を介したアルドステロン産生刺激の阻害（プロテインキナーゼ C 経路）の両作用によるものと考えられる。

LCZ の心血管系及び腎臓に対する臓器保護作用

LCZ は高食塩負荷により誘発された DSS ラットの左室重量増加を有意に抑制し，心肥大に伴う心房伸展により分泌される NT-proANP の上昇も抑制した。一方，LOS による NT-proANP の抑制作用は LCZ に比べて弱かった。LCZ は，ラット心筋梗塞モデルの心肥大を抑制することが報告されており，また LBQ と VAL の併用は，Ang II で誘発されるラットの心筋細胞肥大及び心臓線維芽細胞のコラーゲン産生を，VAL 単独と比較して顕著に抑制した（von Lueder et al. 2013）。

血管に対する作用として，SHRSP でみられる心筋内冠動脈及び腸間膜動脈の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，及び血管 MMP-2 / TIMP-2 のバランス異常に対して，NEP 阻害剤と VAL の併用投与は VAL 単独投与と比べて有意な改善作用を示した（Pu et al. 2008）。

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，GFR 及び ERPF 等の腎機能パラメータを有意に改善した。ERPF に対する改善作用は，LOS 又は HCTZ よりも優れていた。また，高食塩負荷による BUN の上昇も LCZ の投与により抑制された。

腎機能の改善に伴い，腎障害マーカーである KIM-1 及び 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。

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

LCZ の降圧作用を，高血圧モデルである dTGR，SHR，及び DSS ラットを用いて検討した。

- dTGR に LCZ を単回経口投与したところ，用量依存的な MAP の低下がみられ，最高用量 60 mg/kg の投与で平均動脈圧が著明に低下し，その降圧作用は 24 時間持続した。
- SHR に LCZ を 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）の用量で 2 週間反復経口投与したところ，有意な血圧低下がみられ，反復投与中も安定した降圧作用がみられた。
- 高食塩負荷 DSS ラットに LCZ を 68 mg/kg（遊離塩基換算量 60 mgEq/kg）の用量で 2 週間反復経口投与したところ，VAL の曝露量（Cmax 及び AUC）は VAL を 31 mg/kg の用量で投与したときと同程度であったが，降圧作用は LCZ を投与したときの方が強かった。高食塩負荷 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 週間反復経口投与すると，高食塩負荷による血圧上昇は完全に抑制され，正常食塩食を与えたラットの血圧と同程度まで低下した。本試験での LCZ の降圧作用は，LOS 及び HCTZ と比較して強かった。

安全性薬理

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，AHU 及び LBQ による hERG 電流の IC_{50} はいずれも 1000 μM を上回っており，ヒト臨床用量での VAL，AHU 及び LBQ のフリー体 Cmax との比は 773 倍以上であった。LCZ のサルを用いたテレメトリー試験において，100 mg/kg 投与群で平均動脈血圧，収縮期血圧及び拡張期血圧のわずかな低下が投与 6 時間後以降に認められ，投与 18 時間までに回復した。この影響がみられない投与量（25 mg/kg）における VAL のフリー体 Cmax はヒト臨床用量におけるフリー体 Cmax を下回っていた。血圧低下は LCZ の薬理作用であり，ヒトにおいても認められる可能性があるが，添付文書（CTD1.8.1 項）に従った適切な使用をすることでヒトにおける安全性は確保されるものと考える。LCZ を用いた呼吸系及び中枢神経系に関する試験では，ヒト臨床用量における VAL 及び LBQ のフリー体 Cmax のそれぞれ 1.1 倍及び 2.4 倍の曝露量までの評価で影響は認められなかった。AHU の曝露量は臨床用量における曝露量を下回ったと考えられるが，AHU を用いた呼吸系及び中枢神経系に関する試験では 7.4 倍及び 19.3 倍までの AHU の曝露量で影響は認められなかった。

以上のことから，安全性薬理試験で認められた所見が臨床上問題となる可能性は低いと考えられた。

6.2 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。

7 参考文献

[Burke RM, Lighthouse JK, Mickelsen DM, et al. (2019)] Sacubitril/valsartan decreases cardiac fibrosis in left ventricle pressure overload by restoring PKG signaling in cardiac fibroblasts. Circ Heart Fail; 12(4).

[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.

[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.

[Ishii M, Kaikita K, Sato K, et al. (2017)] Cardioprotective effects of LCZ696 (sacubitril/valsartan) after experimental acute myocardial infarction. JACC Basic Transl Sci; 2(6):655-68.

[Kim S, Yoshiyama M, Izumi Y, et al. (2001)] Effects of combination of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on cardiac remodeling, cardiac function, and survival in rat heart failure. Circulation; 103:148-54.

[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.

[Kompa AR, Lu J, Weller TJ, et al. (2018)] Angiotensin receptor neprilysin inhibition provides superior cardioprotection compared to angiotensin converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarction. Int J Cardiol; 258:192-8.

[Ksander GM, Ghai RD, deJesus R, et al. (1995)] Dicarboxylic acid dipeptide neutral endopeptidase inhibitors. J Med Chem; 38(10):1689-700.

[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.

[Langenickel TH and Dole WP (2012)] Angiotensin receptor-neprilysin inhibition with LCZ696: a novel approach for the treatment of heart failure. Drug Discov Today Ther Strateg; 9(4):e131-9.

[Maslov MY, Foianini S, Orlov MV, et al. (2018)] A novel paradigm for sacubitril/valsartan: beta-endorphin elevation as a contributor to exercise tolerance improvement in rats with preexisting heart failure induced by pressure overload. J Card Fail; 24(11):773-82.

[Mehta PK and Griendling KK (2007)] Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol; 292:C82-97.

[Pfau D, Thorn SL, Zhang J, et al. (2019)] Angiotensin receptor neprilysin inhibitor attenuates myocardial remodeling and improves infarct perfusion in experimental heart failure. Sci Rep; 9(1):5791.

[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.

[Suematsu Y, Miura S, Goto M, et al. (2016)] LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, improves cardiac function with the attenuation of fibrosis in heart failure with reduced ejection fraction in streptozotocin-induced diabetic mice. Eur J Heart Fail; 18(4):386-93.

[Torrado J, Cain C, Mauro AG, et al. (2018)] Sacubitril/valsartan averts adverse post-infarction ventricular remodeling and preserves systolic function in rabbits. J Am Coll Cardiol; 72(19):2342-56.

[Trivedi RK, Polhemus DJ, Li Z, et al. (2018)] Combined angiotensin receptor-neprilysin inhibitors improve cardiac and vascular function via increased NO bioavailability in heart failure. J Am Heart Assoc; 7(5):1-14.

[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.

[von Lueder TG, Wang BH, Kompa AR, et al. (2015)] Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy. Circ Heart Fail; 8(1):71-8.

[Weir MR and Dzau VJ (1999)] The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. Am J Hypertens; 12:205S-13S.

[Whyteside AR and Turner AJ (2008)] Human neprilysin-2 (NEP2) and NEP display distinct subcellular localisations and substrate preferences. FEBS Lett; 582(16):2382-6.

[Yoshida K, Kobayashi N, Ohno T, et al. (2007)] Cardioprotective effect of angiotensin II type 1 receptor antagonist associated with bradykinin-endothelial nitric oxide synthase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. J Hypertens; 25:1633-42.

2.6.3 薬理試験概要表

目　次

目　次 2
略号一覧 3
2.6.3.1　薬理試験一覧表 4
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 17
2.6.3.3　副次的薬理試験 17
2.6.3.4　安全性薬理試験 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）
ACE	angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
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
APN	aminopeptidase N	アミノペプチダーゼ N
APP	aminopeptidase P	アミノペプチダーゼ P
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 curve	曲線下面積
BK	bradykinin	ブラジキニン
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	環状グアノシン一リン酸
CHO	chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CMC	carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロース
CSF	cerebrospinal fluid	脳脊髄液
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DOCA	deoxycorticosterone acetate	酢酸デオキシコルチコステロン
DPP	dipeptidyl peptidase	ジペプチジルペプチダーゼ
DSS	Dahl salt-sensitive	Dahl 食塩感受性
dTGR	double-transgenic rat overexpressing human renin and angiotensinogen rat	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	endothelin converting enzyme	エンドセリン変換酵素
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
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
IDE	insulin degrading enzyme	インスリン分解酵素
i.v.	intravenous	静脈内
KIM-1	kidney injury molecule-1	腎障害分子-1
MAP	mean arterial pressure	平均動脈圧
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
p.o.	Latin (per os); oral	経口
q.d.	Latin (quaque die); once a day	1 日 1 回
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

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
>*In vitro* pharmacology					
AHU377, LBQ657, valsartan, thiorphan, and omapatrilat inhibition of *in vitro* recombinant human neprilysin (NEP) and NEP-2 enzyme activities	Concentration-response relationships with AHU377, LBQ657, valsartan, thiorphan, and omapatrilat were derived to estimate IC_{50} values for inhibition of human NEP and NEP-2 enzyme activities. The NEP inhibitory potency of LBQ657 was also determined in the presence of human plasma.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2013-00079]	4.2.1.1-1
AHU377 inhibition of *in vitro* NEP activity from human and rat kidneys	Concentration-response relationships with AHU377 were derived to estimate IC_{50} values for inhibition of human and rat NEP from kidney cortex homogenates.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2004-50317]	4.2.1.1-2
LBQ657 inhibition of *in vitro* NEP activity from human and rat kidneys and angiotensin converting enzyme (ACE) activity from rabbit and human lung	Concentration-response relationships with LBQ657 were derived to estimate IC_{50} values for inhibition of human and rat NEP from kidney cortex homogenates and for inhibition of human and rabbit ACE from lung homogenates.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50314]	4.2.1.1-3
LBQ657 inhibition of *in vitro* recombinant human NEP activity in human cerebrospinal fluid (CSF)	Human NEP was added to human CSF (50% + buffer). Concentration-response relationships with LBQ657 were derived to estimate IC_{50} values for inhibition of human NEP under these conditions.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2014-00338]	4.2.1.1-4
Crystal structure of recombinant human NEP in complex with LBQ657	Human NEP enzyme was crystalized with LBQ657 bound in the active site to determine the binding mode of LBQ657 and the three-dimensional structure of NEP in complex with LBQ657 at 2 Å resolution.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2013-00252]	4.2.1.1-5
AHU377 *in vitro* interaction with recombinant human angiotensin II (Ang II) type-1 (AT_1) receptor	AHU377 was evaluated at 30 µM in a radioligand binding assay using membranes prepared from CHO-K1 cells expressing human AT_1 receptor and [^{125}I]-Sar^1,Ile^8-Ang II as a	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2012-50571]	4.2.1.1-6

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	ligand.				
LBQ657 *in vitro* interaction with recombinant human AT_1 receptor	LBQ657 was evaluated at 30 µM in a radioligand binding assay using membranes prepared from CHO-K1 cells expressing human AT_1 receptor and sarilesin ([^{125}I]-Sar^1,Ile^8-Ang II) as a ligand.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2012-50566]	4.2.1.1-7
CGP48933 (valsartan) *in vitro* interaction with endogenous rat AT_1 receptor and human AT_2 receptor	CGP48933 was evaluated at various concentrations in a radioligand binding assay using membranes prepared from cultured rat aortic smooth muscle cells expressing AT_1 receptor and from human uterine tissue expressing AT_2 receptor and [^{125}I]-Ang II as a ligand.	*In vitro*	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[RD-1990-02642]	4.2.1.1-8
CGP48933 (valsartan) *in vitro* interaction with endogenous rat, dog, marmoset, and human AT_1 receptor	CGP48933 was evaluated at various concentrations in a radioligand binding assay using membranes prepared from adrenal cortical cells (rat, dog, marmoset, human), liver cells (rat, dog, marmoset), and rat aortic smooth muscle cells expressing AT_1 receptor and sarilesin ([^{125}I]-Sar^1,Ile^8-Ang II) as a ligand.	*In vitro*	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03259]	4.2.1.1-9
CGP48933 (valsartan) on Ang II-induced vasoconstriction in *in vitro* rabbit aortic rings	CGP48933 (0.3-10 nM or 2 µM) or vehicle (DMSO) was added to tissue baths containing descending thoracic aortic rings attached to force transducers, followed by Ang II, norepinephrine, serotonin, or KCl to induce contractions.	*In vitro*	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[RD-1990-02643]	4.2.1.1-10
CGP 49309 (R-isomer of valsartan) *in vitro* interaction with endogenous rat AT_1 receptor and on Ang II-induced vasoconstriction in *in vitro* rabbit aortic rings	CGP 49309 was evaluated at various concentrations in the radioligand binding assay and rabbit aortic ring assay described above for [PKF-95-03259] and [RD-1990-02643], respectively.	*In vitro*	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03261]	4.2.1.1-11
CGP48933 (valsartan) on Ang II-stimulated aldosterone release from bovine adrenal	CGP48933 (300 nM) was evaluated on the Ang II-mediated release of aldosterone from freshly dispersed bovine adrenal zona glomerulosa	*In vitro*	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-	[RD-1991-03230]	4.2.1.1-12

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
gland cells	cells.		GEIGY Ltd.)		
Valsartan on Ang II-facilitated norepinephrine release from rat atria	Adult male Sprague Dawley rats were anesthetized, the hearts removed and perfused retrogradely with physiological salt solution to allow dissection of the left atria. Atria were placed in physiologic perfusion chambers, preloaded with [^{3}H]-norepinephrine, and then stimulated electrically to induce norepinephrine release from intrinsic sympathetic nerve endings. Effects of valsartan (10-1000 nM) on the facilitation of this norepinephrine release by Ang II (1-1000 nM) were evaluated.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-1999-02484]	4.2.1.1-13
>*In vivo* pharmacology					
AHU377, valsartan, or the combination on rat renal NEP activity measured *ex vivo*	NEP activity in adult male Sprague Dawley rat renal homogenates was measured *ex vivo* 60 minutes after an oral administration of AHU377 (30 or 100 mg/kg), valsartan (30 mg/kg), a combination of valsartan (30 mg/kg) and AHU377 (100 mg/kg), or vehicle (3% cornstarch in water).	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50315]	4.2.1.1-14
Valsartan on *ex vivo* AT_1 receptor properties in spontaneous hypertensive rats	Valsartan (10 mg/kg/day) or vehicle (5% Arabic gum) was administered to 11-week-old male spontaneously hypertensive rats (SHR) for 27 days. Tissues (adrenal glands, aortas, and kidneys) expressing predominantly AT_1 receptor subtypes were excised and membranes prepared for assessing radioligand binding properties with [^{125}I]-Ang II as a ligand.	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03262]	4.2.1.1-15
LCZ696 on plasma atrial natriuretic peptide (ANP) concentration in conscious rats	Conscious, chronically cannulated, adult male Sprague Dawley rats were infused (450 ng/kg/min i.v.) with ANP for 9 hours. After one hour of infusion, rats were administered LCZ696 (2, 6, 20, or 60 mg/kg), vehicle (empty capsule), or no treatment.	*In vivo*, oral gavage with capsule	Novartis Pharma AG	[RD-2006-51044]	4.2.1.1-16

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	Plasma ANP concentrations were measured pre- and post-dosing at various times by a commercial enzyme immunoassay kit.				
AHU377 on plasma ANP concentration in conscious rats	Conscious, cannulated, adult male Sprague Dawley rats were infused (450 ng/kg/min i.v.) with ANP for 5 hours. After one hour of infusion, rats were administered AHU377 (1, 3, 10, or 30 mg/kg) or vehicle (3% cornstarch). Plasma ANP concentrations were measured pre- and post-dosing at various times by a custom radioimmunoassay.	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG	[RD-2002-50641]	4.2.1.1-17
AHU377 on plasma ANP concentration in anesthetized dogs	Adult mongrel dogs were fasted for 18 hours, anesthetized with sodium pentobarbital, tracheally intubated, and artificially ventilated with room air. Catheters were placed in a femoral artery and vein to obtain blood samples and administer anesthetic and ANP. The duodenum was isolated and a catheter inserted for the administration of AHU377. ANP was infused (450 ng/kg/min i.v.) for 6 hours. After one hour of infusion, dogs were administered AHU377 (3, 10, or 30 mg/kg) or vehicle (3% cornstarch in water). Plasma ANP concentrations were measured pre- and post-dosing at various times by a custom radioimmunoassay.	*In vivo*, intraduodenally by implanted catheter	Novartis Pharma AG	[RD-2002-50641]	4.2.1.1-17
LCZ696, losartan, hydrochlorothiazide (HCTZ), or the losartan/HCTZ combination on cardiorenal biomarkers and hemodynamics in conscious Dahl salt-sensitive (DSS) rats on high-salt diet	Male (7 weeks old) DSS rats were fed a normal-salt diet (0.49% NaCl) throughout the study or a high-salt diet (4% NaCl) for three weeks before treatment and thereafter. Rats on a high-salt diet received either LCZ696 (68 mg/kg/day), losartan (30 mg/kg/day), HCTZ (9.7 mg/kg/day), the losartan/HCTZ combination, or vehicle (corn oil) for 4 weeks. Endpoints included water intake, urine volume, urinary sodium and cyclic guanosine	*In vivo*, q.d. by oral gavage	Novartis Pharma AG	[RD-2013-50369]	4.2.1.1-18

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	monophosphate (cGMP) excretion rates, arterial pressure, plasma N-terminal pro-ANP, glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, renal blood flow, blood urea nitrogen, renal injury markers (kidney injury molecule-1 (KIM-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), and osteopontin), and terminal left-ventricular weights.				
AHU377 on enhancement of diuresis and natriuresis produced by exogenous ANP in anesthetized rats	Adult male Sprague Dawley rats were anesthetized with thiobutabarbital and catheters were inserted in a femoral artery and vein, the urinary bladder, and the proximal duodenum to measure arterial pressure, administer ANP, collect urine, and administer treatments, respectively. A continuous infusion of normal saline (33 µL/min) was maintained throughout the experiment to promote diuresis and natriuresis. Urinary volumes and urinary sodium excretion rates were measured before and after administration of AHU377 (30 mg/kg) or vehicle (3% cornstarch in water) and then again after ANP injection (1 µg/kg i.v. bolus).	*In vivo*, intraduodenally by implanted catheter	Novartis Pharma AG	[RD-2002-50823]	4.2.1.1-19
Valsartan on diuresis and natriuresis in conscious rats	Female rats (Tif:RAIf(SPF)) were administered valsartan (3, 10, 30, 100 mg/kg) or vehicle (methycellulose), and urine was collected over two 3-hour periods post-dosing to determine the effects on urine volume and sodium, potassium, and chloride excretion.	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[RD-1990-02641]	4.2.1.1-20
Valsartan on end-organ damage in conscious stroke-prone SHR (SHRSP)	SHRSP were administered valsartan (3, 10, 30 mg/kg/day p.o.) or vehicle (0.5% carboxymethylcellulose) for 48 weeks starting at ~8 weeks of age. Rats were assessed daily for behavioral signs of stroke or for histologic evidence of cerebral hemorrhage post-mortem. Additionally, heart weights, aortic wall:lumen ratio, proteinuria, and renal histopathologic	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[RD-1995-03259]	4.2.1.1-21

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	lesions were assessed.				
Valsartan on hemodynamics after induction of heart failure by myocardial infarction (MI) in conscious rats	Male Wistar rats underwent a surgical procedure to permanently ligate the left coronary artery and thereby elicit an MI. Starting one day post-operatively, valsartan (10, 30 mg/kg/day), enalapril (3 mg/kg/day), or vehicle (0.5% carboxymethyl cellulose) was administered for 4 weeks. At that time, the rats were anesthetized and surgically instrumented to measure arterial pressure, heart rate, left-ventricular pressure, and cardiac output. Infarct size was measured by tripheynyltetrazolium chloride staining.	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03265]	4.2.1.1-22
Valsartan on hemodynamics and cell proliferation after induction of heart failure by myocardial infarction (MI) in conscious rats	Male Wistar rats underwent a surgical procedure to permanently ligate the left anterior descending coronary artery and thereby elicit an MI. Selected animals were also surgically instrumented with an ascending aortic flow probe and a femoral arterial catheter for monitoring cardiac output and arterial pressure, respectively, while in the conscious state. Valsartan (1, 3, 10 mg/kg/day) or benazepril (3 mg/kg/day) was administered starting immediately after (early) or 21 days after (late) the MI and continuing for 21 and 14 days, respectively. Total and endothelial cell (distinguished by lectin staining) proliferation (5-bromo-2-deoxyuridine incorporation) in the non-infarcted heart tissue were assessed immunohistochemically. Infarct size was determined morphometrically on Azan-stained sections.	*In vivo*, subcutaneously by implanted osmotic minipump	[redacted]	[RD-1995-03294]	4.2.1.1-23
LCZ696 on arterial pressure in conscious rats with renin-dependent hypertension	Adult male double-transgenic rats (dTGRs) that overexpress human renin and angiotensinogen were surgically implanted with a radiotransmitter/catheter in the abdominal aorta	*In vivo*, oral gavage with capsule	Novartis Pharma AG	[RD-2006-51202]	4.2.1.1-24

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	for measurement of arterial pressure. After recovery from the surgery, the conscious rats were administered LCZ696 (2, 6, 20, or 60 mg/kg) or vehicle (empty capsule) to determine the effect on blood pressure.				
AHU377 on arterial pressure in conscious rats with deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-dependent hypertension	Male Sprague-Dawley rats underwent a unilateral nephrectomy and one week later were implanted (subcutaneously) with silicone pellets containing 100 mg/kg of DOCA. The rats were maintained on 1% NaCl:0.2% KCl drinking water for 3-5 weeks until sustained hypertension was established. Rats were then surgically implanted with a catheter in a femoral artery for measurement of mean arterial pressure (MAP). Forty-eight hours later, MAP was recorded for 1 hour before and for 5 hours after administration of AHU377 (30 mg/kg) or vehicle (3% cornstarch).	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG	[RD-2002-50881]	4.2.1.1-25
Valsartan on arterial pressure in conscious rats with DOCA-salt-dependent hypertension	Male Sprague Dawley rats underwent a unilateral nephrectomy, were switched to 1% NaCl drinking water, and were injected with DOCA (30 mg/kg s.c.) once per week for 6-7 weeks to render them hypertensive. Systolic arterial pressure was measured by tail plethysmography at 1, 3, 5, 8, and 24 post-dosing with valsartan (10, 30 mg/kg) or vehicle (5% Arabic gum).	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03268]	4.2.1.1-26
Valsartan on arterial pressure in conscious rats with normal-renin, salt-insensitive hypertension	Male SHR (10 weeks old) were administered valsartan (1, 3, 10, 30 mg/kg) or vehicle (5% Arabic gum) daily for 28 days. Systolic arterial pressure was measured by tail plethysmography at 1, 3, 5, 8, and 24 hours after the first administration, and just before and 24 hours after treatment on days 8, 15, 22, and 26.	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03268]	4.2.1.1-26
LCZ696 on arterial pressure in conscious	Male (7-8 weeks old) DSS rats were surgically	*In vivo*,	Novartis Pharma AG	[RD-2011-50290]	4.2.1.1-27

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
DSS rats with low-renin, volume-dependent hypertension	implanted with a radiotransmitter/catheter in the abdominal aorta for measurement of arterial pressure. After 5-6 days of post-operative recovery, baseline parameters were measured for two days while the rats were on normal chow diet. The rats were then switched to a high-salt (8%) chow diet, which was maintained for the duration of the study. After 8 days on the high-salt diet, rats were administered LCZ696 (68 mg/kg/day), an equimolar dose of valsartan (31 mg/kg/day), or vehicle (water) for 14 days followed by 14 days of recovery. Arterial pressure was recorded every 10 minutes throughout the study.	q.d. by oral gavage			
LCZ696 on arterial pressure in conscious rats with normal-renin, salt-insensitive hypertension	Adult male spontaneously hypertensive rats (SHR) were implanted with a radiotransmitter/catheter in the abdominal aorta via a femoral artery for measurement of arterial pressure. After 4 weeks of recovery, baseline arterial pressure was recorded for 3 days. Rats were then administered LCZ696 (68 mg/kg/day), an equimolar dose of valsartan (31 mg/kg/day), or vehicle (water) for 14 days followed by 14 days of recovery. Arterial pressure was recorded every 10 minutes throughout the study.	*In vivo*, q.d. by oral gavage	Novartis Pharma AG	[RD-2011-50289]	4.2.1.1-28
AHU377 or LBQ657 on plasma NEP activity and plasma AHU377 and/or LBQ657 concentrations in conscious monkeys	Adult male cynomolgus monkeys were surgically implanted with a femoral or jugular venous catheter terminated by a vascular access port. Monkeys were trained to sit quietly in a primate restraining chair during the experiments. On the day of the experiment, blood samples were collected before and for 8 hours after (and at 24 hours the next day) after administration of AHU377 (1 mg/kg i.v. bolus; 3, 10, and 30 mg/kg p.o.) or LBQ657 (1 mg/kg	*In vivo*, oral or nasogastric gavage or i.v.	Novartis Pharma AG	[RD-2013-00171]	4.2.1.1-29

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	i.v. bolus). Plasma NEP activity was measured *ex vivo* with a custom fluorescent assay.				
Valsartan on plasma RAAS biomarkers in conscious rats	Adult male Sprague Dawley rats were placed on a low-sodium diet for 2 weeks to activate the RAAS. Plasma concentrations of Ang II, renin, and aldosterone were measured before and 4, 6, 24, and 72 hours after a single administration of valsartan (10 mg/kg) or vehicle. Additional rats (sodium replete and sodium depleted) were surgically cannulated for measuring arterial pressure and infusing Ang II (0.1 µg/min i.v. for 30 minutes). Ang II was infused, a blood sample collected for measuring aldosterone concentration, the rats dosed with valsartan (10 mg/kg) or vehicle, and Ang II infusions/blood collections repeated at 4, 6, and 24 hours post-dosing.	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[RD-1991-03231]	4.2.1.1-30
LCZ696, AHU377, valsartan, and benazepril on renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) biomarkers and plasma cGMP concentrations in conscious dogs	Adult beagle dogs were placed on a low-salt diet for 5 days before starting the treatments and thereafter during the study period to activate the RAAS. For 10 days, dogs were administered treatments of LCZ696 (15 or 45 mg/kg/day), valsartan (60 mg/kg/day), AHU377 (24 mg/kg/day), benazepril (0.33 mg/kg/day), or vehicle using an incomplete 3-way cross-over design. Blood samples were collected by venipuncture from a jugular or brachiocephalic vein over 12 hours on days 1, 5, and 10 of treatment and analyzed for plasma biomarkers (renin activity and renin, angiotensin I, Ang II, aldosterone, cortisol, and cGMP concentrations) and drug levels. Urine samples were drawn on day 5 for determination of 24-hr excretions of aldosterone, cortisol, cGMP, sodium, and potassium and for determination of fractional excretions of sodium and potassium.	*In vivo*, q.d. p.o. by palatable tablet	Novartis Pharma AG	[CRA 11-014]	4.2.1.1-31

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
Valsartan on plasma RAAS biomarkers and ANP during pacing-induced heart failure in conscious dogs	Adult male beagle dogs were surgically implanted with ventricular pacing leads, an ascending aortic flow probe for monitoring cardiac output, a solid-state pressure transducer in the left-ventricular chamber for measuring left-ventricular pressure, and a femoral arterial catheter for assessing arterial pressure. After 2 weeks of post-operative recovery, rapid ventricular pacing (240 beat/minute) was initiated for two weeks to induce heart failure. During this experimental period, the effects of daily administrations of valsartan (30 and 100 mg/kg/day) or vehicle (gelatin capsule) on plasma hormones (renin activity and concentrations of aldosterone, Ang II, and ANP) and hemodynamics were measured.	*In vivo*, orally by capsule	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03263]	4.2.1.1-32
Secondary Pharmacodynamics					
>*In vitro* pharmacology					
AHU377, LBQ657, valsartan, enalaprilat, thiorphan, and omapatrilat inhibition of *in vitro* recombinant human enzyme activities	Concentration-response relationships with AHU377, LBQ657, valsartan, enalaprilat, thiorphan, and omapatrilat were derived to estimate IC_{50} values for inhibition of these human enzyme activities: NEP, NEP-2, ACE-1, ECE-1, ECE-2, IDE, APN, APP-2, meprin-α, meprin-β, DPP-4.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2013-00079]	4.2.1.1-1
LBQ657, thiorphan and enalaprilat inhibition of *in vitro* NEP activity from human and rat kidneys	Concentration-response relationships with thiorphan and enalaprilat were derived to estimate IC_{50} values for inhibition of human and rat NEP from kidney homogenate preparations.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50314]	4.2.1.1-3
LBQ657 inhibition of *in vitro* aminopeptidase P (APP) activity	Solubilized APP was derived from human colonic carcinoma Caco-2 cells. LBQ657 was tested at a single concentration of 1 mM.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50318]	4.2.1.2-1
AHU377 inhibition of *in vitro* G-protein-coupled receptors (GPCRs), transporters, ion channels, nuclear receptors, and enzymes	AHU377 was tested at 10 or 30 µM in a panel of radioligand binding and functional assays on 37 GPCRs, 5 ion channels, 6 nuclear receptors,	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2012-50571]	4.2.1.1-6

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
(off-target panel)	4 transporters, and 5 enzymes.				
AHU377 inhibition of *in vitro* kinases (off-target panel)	AHU377 was tested at 30 µM against the activity of 62 protein kinases using the Caliper mobility shift methodology.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2013-00245]	4.2.1.2-2
LBQ657 inhibition of *in vitro* GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors, and enzymes (off-target panel)	LBQ657 was tested at a single concentration of 10 µM or up to 30 µM in a panel of radioligand binding and functional assays on 129 GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors and enzymes.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2012-50566]	4.2.1.1-7
LBQ657 inhibition of *in vitro* kinases (off-target panel)	LBQ657 was tested at 30 µM against the activity of 62 protein kinases using the Caliper mobility shift methodology.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2013-00246]	4.2.1.2-3
Valsartan inhibition of *in vitro* GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors, and enzymes (off-target panel)	Valsartan was tested at concentrations of 10 and/or 30 µM in a panel of radioligand binding and functional assays on 81 GPCRs, transporters, ion channels, nuclear receptors and enzymes.	*In vitro*	Novartis Pharma AG	[RD-2014-00323]	4.2.1.2-4
Valsartan inhibition of *in vitro* receptors and L-type calcium channel (off-target panel)	Valsartan was tested at a single concentration of 10 µM in a panel of radioligand binding assays on 13 neurotransmitter receptors and on the L-type calcium channel.	*In vitro*	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-90-02611]	4.2.1.2-5
>*In vivo* pharmacology					
AHU377, valsartan, or the physical combination on bradykinin (BK)-induced paw edema in conscious SHR	Hind-paw volumes were measured in adult male SHRs by plethysmography. Pre-drug volumes of both hind paws were measured. Rats were administered a single dose of AHU377 (100 mg/kg), valsartan (30 mg/kg), the combination, or vehicle (3% cornstarch in water). Thirty minutes later, the baseline (post-drug) paw volumes were measured. The animals were then briefly anesthetized by placing them in a (100%) CO_2 chamber, and BK (3 µg) was injected into the subplantar region of	*In vivo*, by oral gavage	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50363]	4.2.1.2-6

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	the left hind paw. Likewise, the right hind paw was injected with 0.1 ml of sterile BK vehicle (saline). Volumes of both paws were measured at 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 hours after the BK injection to determine the time-course and magnitude of the BK-induced paw edema response relative to the contralateral saline-mediated response.				
Enalapril and omapatrilat on BK-induced paw edema in conscious SHR and Sprague-Dawley rats	Hind-paw volumes were measured in adult male SHR and juvenile and adult male Sprague-Dawley rats by plethysmography. Pre-drug volumes of both hind paws were measured. Rats were administered a single dose of enalapril (10, 30, 100 mg/kg), omapatrilat (30 mg/kg), or vehicle (3% cornstarch in water). Thirty minutes later, the baseline (post-drug) paw volumes were measured. The animals were then briefly anesthetized by placing them in a (100%) CO_2 chamber, and BK (3 µg) was injected into the subplantar region of the left hind paw. Likewise, the right hind paw was injected with 0.1 ml of sterile BK vehicle (saline). Volumes of both paws were measured at 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 hours after the BK injection to determine the time-course and magnitude of the BK-induced paw edema response relative to the contralateral saline-mediated response.	*In vivo*, by oral gavage	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50307]	4.2.1.2-7
Enalapril and omapatrilat on BK-induced blood-pressure response in Sprague Dawley rats	Adult male Sprague Dawley rats were fasted overnight, then anesthetized with thiobutabarbital. Catheters were inserted into a femoral artery for recording MAP, into a femoral vein for infusion of BK, and into the proximal duodenum for administering treatments. After a 30-minute stabilization period, enalapril (30 mg/kg), omapatrilat	*In vivo*, intraduodenally by implanted catheter	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50365]	4.2.1.2-8

Type of study	Test system or protocol	Method of administration	Testing facility	Report number	Location in CTD
	(30 mg/kg), or vehicle (3% cornstarch in water) was injected into the duodenum. After 90 minutes, BK (1 µg/kg/min i.v.) infusion was initiated and continued for 60 minutes. Changes in MAP during the BK infusion were measured from the baseline MAP (average MAP during the 5 minutes before starting the BK infusion).				
AHU377, valsartan, or the combination on BK-induced blood-pressure response in Sprague Dawley rats	Adult male Sprague Dawley rats were fasted overnight, then anesthetized with thiobutabarbital. Catheters were inserted into a femoral artery to record MAP, into a femoral vein for infusion of BK, and into the proximal duodenum for administration of treatments. After a 30-minute stabilization period, AHU377 (100 mg/kg), valsartan (30 mg/kg), their combination, or vehicle (3% cornstarch in water) was injected into the duodenum. After 90 minutes, BK (1 µg/kg/min i.v.) infusion was initiated and continued for 60 minutes. Changes in MAP during the BK infusion were measured from the baseline MAP (average MAP during the 5 minutes before starting the BK infusion).	*In vivo*, intraduodenally by implanted catheter	Novartis Pharma AG	[RD-2005-50366]	4.2.1.2-9
High-dose valsartan on arterial pressure in sodium-replete, normotensive marmosets	Adult male marmosets were surgically implanted with aortic catheters attached to telemetry transmitters for continuously measuring arterial pressure. Toxicologic-level doses of valsartan (60, 120, and 200 mg/kg/day) or vehicle (0.5% Tween 80 + 0.5% carboxymethylcellulose) were administered for 4 weeks to assess their blood pressure effects.	*In vivo*, oral gavage	Novartis Pharma AG (Formerly CIBA-GEIGY Ltd.)	[PKF-95-03258]	4.2.1.2-10

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

2.6.3.1 に記載。

2.6.3.3　副次的薬理試験

2.6.3.1 に記載。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ systems evaluated	Compound	Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Report number	Location in CTD
Cardiovascular (non-GLP)	LCZ696	*In vitro*/ HEK293	Patch clamp at 35ºC	LCZ696: 10, 100, 787, 3000 µM; Vehicle: DMSO; Terfenadine: 60 nM	n≥3 (LCZ696) n=2 (Terfenadine)	LCZ696: 0.7, 1.8, 1.7, 2.9 and 32.4% inhibition at 0, 10, 100, 787 and 3000 µM Terfenadine: 78.8 ± 2.6% inhibition Conclusion: LCZ696 hERG IC50 >3000 µM	[0670356]	4.2.1.3-1
Cardiovascular (non-GLP)	AHU377	*In vitro*/ HEK293	Patch clamp at 36ºC	AHU377: 1 mM; Vehicle: DMSO; Reference item: E-4031: 100 nM	n=5	AHU377: At maximum soluble concentration (1 mM) AHU377 produced a residual tail current of 103.9% ±4.9% relative to control. Vehicle (0.1% DMSO) control: produced a residual tail current of 94.8% (5.2% decrease). E-4031 (100 nM): produced a residual tail current of 7.2 ±5.3% (92.8% decrease) Conclusion: AHU377 did not inhibit hERG channels stably expressed in HEK293 cells at its highest soluble concentration of 1 mM. The IC50 for hERG inhibition is >1 mM	[0359201]	4.2.1.3-2
Cardiovascular (GLP)	LBQ657	*In vitro*/ HEK293	Patch clamp at 33-35ºC	LBQ657: 100, 300, 1000 µM; Vehicle: DMSO; Terfenadine: 60 nM	n=3 (LBQ657) n=2 (Terfenadine)	LBQ657: 2.8, 1.1, 4.9 and 6.7% inhibition at 0, 100, 300 and 1000 µM Terfenadine: 82.0 ± 0.5% inhibition Conclusion: LBQ657 hERG IC50 >1000 µM	[1570187]	4.2.1.3-3

Organ systems evaluated	Compound	Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Report number	Location in CTD
Cardiovascular (GLP)	LCZ696	Monkey/ Cynomolgus	Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions	0, 25, 100 mg/kg	M: 4 (latin square dosing design)	25 mg/kg: No compound-related effects on hemodynamic, electrocardiographic parameters. 100 mg/kg: Slight decreases in mean arterial (14 mmHg or 17.9%), systolic (13 mmHg or 14.5%) and diastolic (14 mmHg or 22%) pulse pressures consistent with pharmacologic effects beginning at 6 hr post dose, with maximal effects at 10-11 hr post dose. No effects on heart rate or electrocardiographic parameters.	[0670360]	4.2.1.3-4
Cardiovascular (GLP)	AHU377	Dog/ Beagle	Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions	AHU377: 0, 50, 250 on days 1, 4, 8 (Escalating dose)	F: 4	AHU377: No test article-related alterations in electrocardiographic parameters, blood pressure, heart rate, or body temperature. Conclusion: No adverse effects on cardiovascular function as measured by telemetry in conscious dogs	[0470026]	4.2.1.3-5
Respiratory (GLP)	LCZ696	Rat/ Han Wistar	Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions	0, 200, 600	M: 6	No adverse effects on ventilatory parameters (tidal volume, respiratory rate, derived minute volume) as assessed by 'head out' plethysmography. Conclusion: No adverse effects on respiratory function	[0670393]	4.2.1.3-6
Respiratory (GLP)	AHU377	Rat/ Han Wistar	Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions	AHU377: 0, 250, 1000, 2000	M: 6	No adverse effects on ventilatory parameters (tidal volume, respiratory rate, derived minute volume) as assessed by 'head out' plethysmography. Conclusion: No adverse effects on respiratory function	[0480095]	4.2.1.3-7

Organ systems evaluated	Compound	Species/ strain	Method of administration (vehicle/ formulation)	Doses (mg/kg) [a]	Gender and no. per group	Significant findings	Report number	Location in CTD
Central nervous system (GLP)	LCZ696	Rat/ Han Wistar	Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions	0, 200, 600	M: 10	200 mg/kg: No compound-related clinical signs 600 mg/kg: Decreased fecal excretion Conclusion: No adverse neurobehavioral effects	[0670464]	4.2.1.3-8
Central nervous system (GLP)	AHU377	Mouse/ CD-1	Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions	AHU377: 0, 2000	M: 10 (AHU377); M: 5 (control)	No test article-related effects of AHU377 on neurobehavioral activity or body temperature. Conclusion: No adverse neurobehavioral effects	[0470089]	4.2.1.3-9

a = single dose unless specified otherwise

M = male; F = female; CMC = carboxymethylcellulose; DMSO = dimethyl sulfoxide