# 2.6.6 毒性試験の概要文

# 目　次

目　次 ..... 2
表 一 覧 ..... 4
略号一覧 ..... 7
1 まとめ ..... 8
2 単回投与毒性試験 ..... 10
2.1 LCZ ..... 10
2.2 AHU ..... 11
2.2.1 マウスを用いた単回経口投与毒性試験 ..... 11
2.2.2 マウスを用いた単回腹腔内投与毒性試験 ..... 11
2.2.3 ラットを用いた単回経口投与毒性試験 ..... 11
2.2.4 ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験 ..... 12
3 反復投与毒性試験 ..... 12
3.1 LCZ ..... 12
3.1.1 マウスを用いた 2 週間反復経口投与用量設定試験 ..... 12
3.1.2 マウスを用いた 13 週間反復経口投与用量設定試験 ..... 13
3.1.3 ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験 ..... 14
3.1.4 ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験（追加試験） ..... 16
3.1.5 ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験 ..... 16
3.1.6 ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験 ..... 17
3.1.7 サルを用いた 1 週間反復経口投与用量設定試験 ..... 18
3.1.8 サルを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験 ..... 19
3.1.9 サルを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験 ..... 20
3.1.10 サルを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験 ..... 21
3.2 AHU ..... 22
3.2.1 マウスを用いた 5 日間反復経口投与毒性試験 ..... 22
3.2.2 B6C3F1 系マウスを用いた 1 週間反復経口投与毒性試験 ..... 22
3.2.3 マウスを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験 ..... 22
3.2.4 ラットを用いた 1 週間反復経口投与毒性試験 ..... 23
3.2.5 ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験 ..... 24
3.2.6 ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験（追加試験） ..... 25
3.2.7 ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験 ..... 26
3.2.8 ラットを用いた 4 及び 13 週間反復経口投与毒性試験 ..... 27
3.2.9 ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験 ..... 29
3.2.10 マーモセットを用いた 1 週間反復経口投与用量設定試験 ..... 29
3.2.11 マーモセットを用いた 52 週間反復経口投与毒性試験 ..... 30

4 遺伝毒性試験 ..... 31
4.1 AHU ..... 31
4.1.1 ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験 ..... 31
4.1.2 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 ..... 32
4.1.3 ラットを用いた骨髄小核試験 ..... 32
4.2 LBQ657 ..... 32
4.2.1 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 ..... 32
4.3 VAL ..... 33
4.4 LCZ ..... 33
4.4.1 ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験 ..... 33
4.4.2 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 ..... 33
4.4.3 ラットを用いた骨髄小核試験 ..... 33
5 がん原性試験 ..... 34
5.1 LCZ ..... 34
5.2 AHU ..... 35
5.2.1 用量設定試験 ..... 35
5.2.2 がん原性試験 ..... 39
5.3 VAL ..... 40
5.4 NEP 遺伝子変異と腫瘍進行との関連性に関する *in silico* 解析 ..... 40
6 生殖発生毒性試験 ..... 41
6.1 LCZ ..... 41
6.1.1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 ..... 41
6.1.2 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 ..... 41
6.1.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験 ..... 42
6.1.4 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 ..... 42
6.1.5 出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験 ..... 43
6.2 AHU ..... 44
6.2.1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 ..... 44
6.2.2 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 ..... 44
6.2.3 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験 ..... 45
6.2.4 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験 ..... 45
6.2.5 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 ..... 46
6.2.6 ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験 ..... 47
6.3 VAL の生殖発生毒性試験 ..... 47
6.4 幼若動物を用いた試験 ..... 48
6.4.1 LCZ ..... 48
6.4.2 AHU ..... 48

6.4.3 VAL ..... 52
7 局所刺激性試験 ..... 54
7.1 LCZ ..... 54
7.1.1 雄ラットを用いた 3 日間反復皮下投与による忍容性試験 ..... 54
7.1.2 雄ラットを用いた経口投与及び皮下投与による 5 日間反復投与探索的毒性試験 ..... 54
7.2 AHU ..... 55
7.2.1 マウスを用いた局所リンパ節試験 ..... 55
7.2.2 ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験 ..... 55
7.2.3 ウサギを用いた眼一次刺激性試験 ..... 55
8 その他の毒性試験 ..... 56
8.1 免疫毒性 ..... 56
8.2 光安全性 ..... 56
8.3 依存性 ..... 56
8.4 NEP 基質への影響に関する探索的試験 ..... 56
8.4.1 LCZ の Aβ 代謝に関する探索的試験 ..... 56
8.4.2 AHU の骨に対する影響に関する探索的試験 ..... 59
8.5 不純物 ..... 61
8.6 その他の試験 ..... 62
8.6.1 AHU のマウスを用いた反復投与毒性試験 ..... 62
9 考察及び結論 ..... 64
10 参考文献 ..... 73

## 表 一 覧

Table 1-1 主な毒性試験一覧 ..... 9
Table 3-1 マウスを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約（試験 14 日） ..... 13
Table 3-2 マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 14
Table 3-3 ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 15
Table 3-4 ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験（追加試験）における曝露量の要約 ..... 16
Table 3-5 ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 17
Table 3-6 ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 18
Table 3-7 サルを用いた 1 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 18
Table 3-8 サルを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 19
Table 3-9 サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 20
Table 3-10 サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 21

Table 3-11 マウスを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 23
Table 3-12 ラットを用いた 1 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 24
Table 3-13 ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 25
Table 3-14 ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 26
Table 3-15 ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 27
Table 3-16 ラットを用いた 4 及び 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 28
Table 3-17 ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 29
Table 3-18 マーモセットを用いた 1 週間反復投与用量設定試験における曝露量の要約 ..... 30
Table 3-19 マーモセットを用いた 52 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 31
Table 5-1 LCZ のがん原性試験における予想曝露量とヒト曝露量との比較 ..... 34
Table 5-2 AHU のがん原性試験における曝露量とヒト曝露量との比較 ..... 35
Table 5-3 マウスを用いた 1 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 36
Table 5-4 マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 36
Table 5-5 マウスを用いた混餌投与による 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 38
Table 5-6 マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 39
Table 6-1 妊娠ラットにおける曝露量の要約 ..... 42
Table 6-2 妊娠ウサギにおける曝露量の要約 ..... 43
Table 6-3 ウサギ胎児における曝露量の要約 ..... 43
Table 6-4 妊娠ラットにおける曝露量の要約 ..... 45
Table 6-5 妊娠ウサギにおける曝露量の要約 ..... 47
Table 6-6 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 49
Table 6-7 幼若ラットを用いた探索的試験における曝露量の要約 ..... 51
Table 6-8 幼若ウサギを用いた反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 52
Table 6-9 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験における曝露量の要約 ..... 53
Table 7-1 雄ラットを用いた皮下投与による忍容試験における曝露量の要約 ..... 54
Table 8-1 サルを用いた探索的試験における曝露量の要約（試験 1 日及び 15 日） ..... 59
Table 8-2 サルを用いた探索的試験における曝露量の要約（試験 16 日） ..... 59
Table 8-3 成熟雌ラットを用いた探索的試験における曝露量の要約 ..... 61
Table 8-4 雄マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験における曝露量の要約 ..... 63
Table 8-5 雄マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験における曝露量の要約 ..... 63

Table 8-6 B6C3F1 系マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験における曝露量の要約 ..... 64
Table 9-1 LCZ 200 mg を 1 日 2 回投与した心不全患者における曝露量の要約..... 69
Table 9-2 LCZ の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比 ..... 70
Table 9-3 AHU の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比 ..... 71

# 略号一覧

| 略号 | 省略していない表現（英） | 省略していない表現（日） |
|---|---|---|
| Aβ | amyloid beta | アミロイドβ |
| ACE | angiotensin converting enzyme | アンジオテンシン変換酵素 |
| AD | Alzheimer's disease | アルツハイマー病 |
| ALP | alkaline phosphatase | アルカリフォスファターゼ |
| ALT | alanine aminotransferase | アラニンアミノトランスフェラーゼ |
| APP | amyloid precursor protein | アミロイド前駆体蛋白 |
| 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 |
| AST | aspartate aminotransferase | アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ |
| $AT_1$ receptor | angiotensin-II receptor, type 1 | アンジオテンシン II 1 型受容体 |
| AUC | area under the drug serum concentration-time curve | 血清中薬物濃度-時間曲線下面積 |
| β-GP | β-glycerolphosphate | β-グリセロリン酸 |
| BUN | blood urea nitrogen | 血液尿素窒素 |
| Cmax | maximum serum concentration after a single dose | 最高血清中薬物濃度 |
| CMC | carboxymethylcellulose | カルボキシメチルセルロース |
| CNP | C-type natriuretic peptide | C 型ナトリウム利尿ペプチド |
| CSF | cerebral spinal fluid | 脳脊髄液 |
| CTx | C-telopeptide | C テロペプチド |
| DMF | N,N-dimethylformamide | N,N-ジメチルホルムアミド |
| DNCB | 1-chloro-2,4,-dinitrobenzene | ジニトロクロロベンゼン |
| DXA | dual-energy x-ray absorptiometry | 2 重エネルギーエックス線吸収測定法 |
| FDA | Food and Drug Administration | 米国食品医薬品局 |
| 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 |
| GWAS | genome wide association study | ゲノムワイド関連解析 |
| HPC | hydroxypropyl cellulose | ヒドロキシプロピルセルロース |
| LLNA | local lymph node assay | 局所リンパ節測定法 |
| 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 |
| MME | membrane metallo-endopeptidase | - |
| 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 |
| NP | natriuretic peptides | ナトリウム利尿ペプチド |
| NPR-A | natriuretic receptor-A | ナトリウム利尿ペプチド受容体 A |
| NPR-C | natriuretic receptor-C | ナトリウム利尿ペプチド受容体 C |
| pQCT | peripheral quantitative computed tomography | 末梢骨定量コンピュータ断層法 |
| PTH | parathyroid hormone | 副甲状腺ホルモン |
| P1NP | procollagen type 1 amino-terminal propeptide | 1 型プロコラーゲン-N-プロペプチド |
| RAAS | renin-angiotension-aldosterone system | レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系 |
| SILK | stable isotope leucine kinetics | 安定同位体標識動態法 |
| TRACP-5b | tartrate resistant acid phosphatase 5b | 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ 5b |

# 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，以下 LCZ）はアンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬（ARNI）に分類される初めての薬剤であり，慢性心不全の治療薬として開発された。LCZ は，経口投与後速やかに溶解し，サクビトリル（開発コード AHU377，以下 AHU）及びアンジオテンシン II 1 型受容体（angiotensin II receptor, type 1，$AT_1$）拮抗作用を有するバルサルタン（以下 VAL）に解離する。プロドラッグである AHU はエステラーゼにより加水分解され，強力かつ選択的なネプリライシン（中性エンドペプチダーゼ 24.11，neprilysin，NEP）阻害作用を有する LBQ657（以下 LBQ）に変換される。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 50mg 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 200mg まで増量する。1 回投与量は 50mg，100mg，又は 200mg 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。」とする予定である。LCZ 400 mg の用量は，AHU 約 200 mg 及び VAL 約 200 mg の用量に相当する。

LCZ の毒性プロファイルは，LCZ，AHU，LBQ 及び VAL の毒性試験成績を用いて総合的に評価した。なお，VAL の毒性試験のうち，ディオバン錠の製造承認申請にて提出した試験成績については，本概要中への詳細な記載は省略した。また，LCZ の $AT_1$ 受容体拮抗作用に関連した毒性が用量制限毒性であるため，AHU の活性本体である LBQ の十分な曝露を確保するために，一部の毒性試験は AHU を用いて実施した。反復投与毒性試験，胚・胎児発生に関する試験及び遺伝毒性試験については，LCZ 及び AHU を用いて実施した。出生前及び出生後の発生に関する試験，幼若動物を用いた試験及びがん原性試験については，AHU の毒性試験のみで評価した。主な毒性試験の一覧をTable 1-1に示す。主要な毒性試験は医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use，ICH）の M3(R2)ガイドライン（医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス），米国食品医薬品局（Food and Drug Administration，FDA）の代謝物の安全性評価に関するガイダンス（FDA Guidance on Safety Testing of Metabolites, February 2008）及びその他の安全性に関する ICH ガイドラインに従い，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice，GLP）に準拠して実施した。これらの毒性試験は，ノバルティス社又は受託研究機関において実施した。

LCZ の毒性試験には，マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルを使用した。非げっ歯類の動物種として，NEP 及びその基質のヒトとの相同性を考慮してカニクイザルを選択した。

LCZ は溶解後，AHU 部分と VAL 部分に分離することから，LCZ の投与液の分析（安定性，均一性及び濃度測定）では，投与液中の AHU 及び VAL を測定した。トキシコキネティクスでは，AHU 及び LBQ，並びに VAL を測定した。

なお，本概要文に記載した LCZ の用量は遊離塩基として示した。三ナトリウムヘミ五水和物塩としての用量は，換算係数 1.078 を使用する。

**Table 1-1 主な毒性試験一覧**

| 試験の種類 | | 投与経路 | 試験系 | 被験物質 |
|---|---|---|---|---|
| 単回投与毒性 | | 経口，腹腔内 | マウス，ラット | AHU |
| 反復投与毒性 | ≤1 週間 | 経口 | サル | LCZ |
| | | 経口 | マウス，ラット，マーモセット | AHU |
| | 2 週間 | 経口 | マウス，ラット，サル | LCZ |
| | | 経口 | マウス，ラット | AHU |
| | 4 週間 | 経口 | マウス，ラット | AHU |
| | 13 週間 | 経口 | マウス，ラット，サル | LCZ |
| | | 経口 | マウス，ラット | AHU |
| | | 混餌 | マウス | AHU |
| | 26 週間 | 経口 | ラット | LCZ, AHU |
| | 39 週間 | 経口 | サル | LCZ |
| | 52 週間 | 経口 | マーモセット | AHU |
| 遺伝毒性 | 遺伝子突然変異 | *in vitro* | ネズミチフス菌 | LCZ, AHU |
| | 染色体異常 | *in vitro* | ヒト末梢血リンパ球 | LCZ, AHU, LBQ |
| | 小核 | 経口 | ラット（骨髄） | LCZ, AHU |
| がん原性 | 104 週間 | 経口 | マウス，ラット | AHU |
| 生殖発生毒性 | 受胎能及び初期胚発生 | 経口 | ラット | LCZ, AHU |
| | 胚・胎児発生 | 経口 | ラット，ウサギ | LCZ, AHU |
| | 出生前及び出生後発生 | 経口 | ラット | AHU |
| | 幼若動物 | 経口 | ラット，ウサギ | AHU |
| | | 経口 | ラット | VAL |
| 局所刺激 | 局所忍容性 | 皮下 | ラット | LCZ |
| | 眼一次刺激性 | 眼窩内 | ウサギ | AHU |
| | 皮膚一次刺激性 | 経皮 | ウサギ | AHU |
| | 皮膚感作性 | 経皮 | マウス | AHU |
| その他の毒性 | 骨形成に関する検討 | *in vitro* | UMR-106 細胞 | AHU |
| | | 経口 | ラット | AHU |
| | Aβ 代謝に関する検討 | 経口 | サル | LCZ |

Aβ = アミロイドβ

LCZ のラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（ラットでは 26 週間まで，サルでは 39 週間までの投与期間）における無毒性量は，いずれの動物種においても 30 mg/kg/日と考えられた。毒性標的器官は胃腸管及び腎臓であった。胃腸管に対する影響として，ラットでは 50 mg/kg/日以上の群で腺胃の可逆的な限局性のびらん及び炎症が認められた。サルでは 30 mg/kg/日以上の群で嘔吐及び下痢が観察されたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。胃の病理組織学的変化はラット及びマーモセットを用いた AHU の反復経口投与毒性試験でも認められており，LCZ による胃炎は主として AHU の局所刺激性に起因した変化と考えられた。

腎臓への影響として，LCZ の 100 mg/kg/日以上の群のサルで傍糸球体細胞の肥大，並びに二次的変化と考えられる網状赤血球数及び赤血球数の低下が認められ，$AT_1$ 受容体拮抗作用に関連した変化と考えられた。同様の変化は，VAL の非臨床毒性試験でも認められている。心臓重量の低下が，LCZ のマウス及びラットを用いた試験，並びに AHU 若しくは VAL のラットを用いた試験で認められ，薬理作用である血圧低下に関連した心負荷の低下により発現した変化と考えられた。

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

LCZ のラット及びウサギを用いた胚・胎児に関する試験では，ウサギで催奇形性が認められ，ラット及びウサギで胚・胎児死亡を含む胚・胎児毒性が確認された。胚毒性及び胎児死亡は，AHU 及び VAL の生殖発生毒性試験でも認められている。VAL のラットを用いた周産期及び授乳期投与試験の高用量群では，出生児において出生後の発生・発達の遅延，体重増加の抑制及び生存率の低下が認められた。AHU のラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験の高用量群では，可逆的で軽度の体重低下が認められた。生殖発生毒性試験の結果，妊娠中のヒトへの LCZ の投与により，胎児に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。雌雄ラットの受胎能に及ぼす LCZ の影響は認められなかった。

AHU の幼若動物を用いた試験では，幼若ラットで体重，骨長及び骨量（骨密度及び骨塩量）の低下がみられたが，幼若ウサギ及び成熟ラットでは骨への影響を示唆する変化は認められなかった。

LCZ のサルを用いたアミロイド β（Amyloid beta，Aβ）の代謝に関する探索的試験では，脳脊髄液（cerebral spinal fluid，CSF）中 Aβ 濃度の増加がみられたが，脳中 Aβ 濃度に変化は認められなかった。サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験の脳の免疫組織化学検査でも，Aβ 沈着及びアミロイド斑の形成は認められなかった。

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

# 2 単回投与毒性試験

## 2.1 LCZ

LCZ の単回投与毒性試験は実施しなかったが，ラットを用いた安全性薬理試験及びサルを用いた短期反復投与毒性試験から概略の致死量を以下のように推定した。

ラットを用いた呼吸系及び中枢神経系に関する安全性薬理試験 [2.6.2-4.2 項]，[2.6.2-4.3 項]では，600 mg/kg までの用量で経口投与した結果，良好な忍容性がみられ，死亡は認められなかったことから，ラットにおける概略の致死量は 600 mg/kg 超と考えられた。サルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（3.1.8 項）では，600 mg/kg の用量で経口投与した結果，死亡は認められなかった。したがって，サルにおける概略の致死量は 600 mg/kg 超と考えられた。

## 2.2 AHU

### 2.2.1 マウスを用いた単回経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.5B-0480024] は，マウスにおける AHU の経口投与による急性毒性を検討する目的で GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 3 例（2000 mg/kg 群は雌雄各 5 例）の ICR 系マウスに，0.5% カルボキシメチルセルロース（carboxymethylcellulose，CMC）液に懸濁した AHU を 0，50，250，1000 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与した。投与後，一般状態の観察及び体重測定を行い，試験 15 日に剖検を実施した。

本試験で死亡はみられず，一般状態，体重及び剖検に AHU 投与の影響は認められなかった。

以上のことから，概略の致死量は 2000 mg/kg 超と考えられた。

### 2.2.2 マウスを用いた単回腹腔内投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.5B-0480022] は，マウスにおける AHU の腹腔内投与による急性毒性を検討する目的で GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 3 例（500 mg/kg 群は雌雄各 5 例）の ICR 系マウスに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，25，50，300 及び 500 mg/kg の用量で腹腔内投与した。投与後，一般状態の観察及び体重測定を行い，試験 15 日に剖検を実施した。

本試験で死亡は認められなかった。一般状態の変化として，500 mg/kg 群では活動性の低下，異常歩行及び異常姿勢が投与 6 時間後まで観察された。体重への影響は認められなかった。剖検では，500 mg/kg 群の雌で肝臓の腫脹が認められた。

以上のことから，概略の致死量は 500 mg/kg 超と考えられた。

### 2.2.3 ラットを用いた単回経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.5B-0480025] は，ラットにおける AHU の経口投与による急性毒性を検討する目的で GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 3 例（2000 mg/kg 群は雌雄各 5 例）の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，50，250，1000 及び 2000 mg/kg の用量で経口投与した。投与後，一般状態の観察及び体重測定を行い，試験 15 日に剖検を実施した。

本試験で死亡はみられず，一般状態，体重及び剖検に AHU 投与の影響は認められなかった。

以上のことから，概略の致死量は 2000 mg/kg 超と考えられた。

### 2.2.4 ラットを用いた単回腹腔内投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.5B-0480023] は，ラットにおける AHU の腹腔内投与による急性毒性を検討する目的で GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 3 例（500 mg/kg 群は雌雄各 5 例）の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，25，50，300 及び 500 mg/kg の用量で腹腔内投与した。投与後，一般状態の観察及び体重測定を行い，試験 15 日に剖検を実施した。

本試験で死亡は認められなかった。一般状態の変化として，25 mg/kg 以上の群で立毛，50 mg/kg 以上の群で筋緊張低下，500 mg/kg 群で活動性低下，歩行異常及び姿勢異常が試験 1 日に認められた。いずれの群においても体重への影響は認められなかった。剖検では，25 mg/kg 以上の群で肝臓の腫脹がみられ，50 mg/kg 以上の群で肝臓及び脾臓の白色変化，肝臓硬化が認められた。

以上のことから，概略の致死量は 500 mg/kg 超と考えられた。

# 3 反復投与毒性試験

## 3.1 LCZ

### 3.1.1 マウスを用いた 2 週間反復経口投与用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.6A-0670221] は，LCZ を経口投与したマウスにおける毒性評価及びがん原性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 5 例の ICR 系マウスに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，50，200，400 及び 800 mg/kg/日の用量で 2 週間反復経口投与した。

800 mg/kg/日群の雄 1 例が試験 9 日に死亡し，雄 1 例を一般状態不良のため試験 9 日に安楽死処分した。死亡例では死亡前に自発運動低下及び脱水がみられ，瀕死例では自発運動低下，蒼白，体温低下，脱水，円背位，筋振戦，下腹部の汚れ，努力呼吸及び無糞が認められた。

一般状態の変化として，400 mg/kg/日群で粗毛及び下腹部の汚れ，800 mg/kg/日群で脱水，自発運動低下，下腹部の汚れ，糞量減少，円背位，または努力呼吸がいずれも少数例に認められた。体重増加の抑制が 800 mg/kg/日群の雌で認められた。摂餌量に本薬投与の影響はみられなかった。

血液学的検査では，800 mg/kg/日群の雌で網状赤血球数の増加がみられた。血液生化学的検査では，400 mg/kg/日以上の群で血液尿素窒素（blood urea nitrogen，BUN）の増加が散見された。

剖検では，本薬投与に関連した異常は認められなかった。器官重量の変化として，心臓重量の低下が 800 mg/kg/日群の雌雄でみられたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。病理組織学的検査では，200 mg/kg/日以上の群の雌雄で腺胃の粘膜下組織，隣接粘膜及び粘膜筋版の混合型炎症，非腺胃部の境界縁の扁平上皮細胞過形成及び角化亢進が認められた。200 mg/kg/日群の雌 1 例及び 800 mg/kg/日群の瀕死例では腺胃のびらんも観察された。

トキシコキネティクスでは，用量増加に伴う AHU，LBQ 及び VAL の曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は 50 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-1 マウスを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約（試験 14 日）**

| 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 50 | 雄 | 18.1 | 14.9 | 1330 | 734 | 811 | 168 |
| | 雌 | 100 | 103 | 1660 | 1080 | 2440 | 493 |
| 200 | 雄 | 964 | 664 | 22300 | 21500 | 5930 | 2690 |
| | 雌 | 2930 | 3730 | 38400 | 41300 | 10300 | 7500 |
| 400 | 雄 | 9080 | 14800 | 225000 | 181000 | 18300 | 13400 |
| | 雌 | 22000 | 39400 | 160000 | 227000 | 20800 | 15300 |
| 800 | 雄 | 69000 | 88200 | 3780000 | 330000 | 681000 | 69800 |
| | 雌 | 145000 | 80800 | 2160000 | 682000 | 740000 | 252000 |

Source: Table 2.6.7.6A-0670221
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.1.2 マウスを用いた 13 週間反復経口投与用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.7A-0670524] は，LCZ の 13 週間反復経口投与によりマウスで発現する毒性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の ICR 系マウスに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，50，100，200 及び 400 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。

本薬投与に関連した死亡が 400 mg/kg/日群の雌（3/30）で認められた。一般状態の変化として，50 mg/kg/日以上の群で攻撃性（雄のみ），過度の毛づくろい，接触に対する反応亢進，蒼白，脱水，腹部膨満，円背位，脱毛，立毛，自発運動亢進／低下，攣縮，努力性呼吸（雄のみ），呼吸数増加（雄のみ）が認められた。体重，摂餌量及び眼科学的検査では，本薬投与に関連した異常はみられなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査では，本薬投与に関連した変化は認められなかった。

剖検では異常はみられなかった。器官重量の変化として，50 mg/kg/日以上の群の雌で腎重量の増加が，400 mg/kg/日群の雄で心重量の低下が認められた。病理組織学的検査では，50 mg/kg/日以上の群の雌雄で，腺胃の粘膜下組織及び境界縁の混合型炎症，腺上皮細胞細胞質の拡張がみられ，400 mg/kg/日群では境界縁及び非腺胃隣接部の扁平上皮細胞過形成及び角化亢進が認められた。200 mg/kg/日群の雄で腺胃のびらんが，400 mg/kg/日群の雄で前胃の潰瘍が散見された。

トキシコキネティクスでは，用量増加に伴う AHU，LBQ 及び VAL の曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，本薬投与に関連した胃の病理組織学的変化が 50 mg/kg/日群から認められたため，本試験では無毒性量を設定することはできなかった。

**Table 3-2　　マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 50 | 雄 | 105 | 51.7 | 1920 | 929 | 558 | 133 |
| | | 雌 | 425 | 115 | 20100 | 6800 | 1510 | 259 |
| | 100 | 雄 | 197 | 81.6 | 3860 | 2820 | 1350 | 439 |
| | | 雌 | 758 | 166 | 38900 | 5870 | 3840 | 665 |
| | 200 | 雄 | 490 | 179 | 14900 | 9680 | 3120 | 548 |
| | | 雌 | 932 | 282 | 36900 | 8060 | 5480 | 1630 |
| | 400 | 雄 | 1560 | 748 | 34100 | 23100 | 4320 | 1600 |
| | | 雌 | 6500 | 628 | 295000 | 25500 | 20600 | 2520 |
| 試験 75 日 | 50 | 雄 | 67.9 | 58.9 | 1560 | 1330 | 684 | 338 |
| | | 雌 | 388 | 94.1 | 54500 | 4440 | 2690 | 535 |
| | 100 | 雄 | 223 | 86.4 | 4170 | 1560 | 1670 | 454 |
| | | 雌 | 462 | 644 | 12100 | 6790 | 2800 | 2210 |
| | 200 | 雄 | 224 | 164 | 8660 | 4690 | 3620 | 1470 |
| | | 雌 | 3630 | 1660 | 363000 | 31100 | 14800 | 4020 |
| | 400 | 雄 | 1050 | 1330 | 56100 | 52700 | 7850 | 3120 |
| | | 雌 | 14500 | 14200 | 78300 | 62300 | 16800 | 7180 |

Source: Table 2.6.7.7A-0670524
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.1.3　　ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.6A-0670220] は，LCZ の 2 週間反復経口投与によりラットで発現する毒性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，50，200，600 及び 1200 mg/kg/日の用量で 2 週間経口投与した。

1200 mg/kg/日群の雄 1 例，雌 2 例が死亡し，600 mg/kg/日群の雄 1 例，1200 mg/kg/日群の雄 1 例及び雌 2 例を一般状態不良のため安楽死処分した。いずれの個体においても病理学的検査で死亡・瀕死の原因を特定することはできなかったが，投与に関連したものと考えられた。なお，50 mg/kg/日群及び 600 mg/kg/日群で認められた雄各 1 例の死亡は，採血手技の過誤によるものと判断した。

一般状態の変化として，600 mg/kg/日以上の群で，蒼白，冷触感，腹部膨満，円背位，努力呼吸，異常呼吸音（ラ音），自発運動低下，鼻汁，糞便異常（軟便，下痢，粘液便）及び流涎が，1200 mg/kg/日群では糞量減少，血便，正向反射障害及び異常発声が認められた。体重増加の抑制が，すべての LCZ 投与群でみられ，1200 mg/kg/日群の雄では平均体重の低下が認められた。摂餌量の低下が，600 mg/kg/日以上の群で認められた。眼科学的検査では，600 mg/kg/日以上の群で，網膜血管菲薄及び血管系縮小を伴う眼底淡色化が認められた。

血液学的検査では，50 mg/kg/日以上の群の雄及び 200 mg/kg/日以上の群の雌で網状赤血球数の低下が，200 mg/kg/日以上の群で赤血球系パラメータの低下が認められた。血液生化学的検査で

は，200 mg/kg/日以上の群で BUN 及びマグネシウムの増加が認められた。尿検査では本薬投与に関連した変化は認められなかった。

剖検では，600 mg/kg/日以上の群で，胃に赤色巣，胃及び腸管にガス貯留が認められた。器官重量の変化として，200 mg/kg/日以上の群で心臓重量の低下が，1200 mg/kg/日群で肝臓及び下垂体重量の低下が，600 mg/kg/日以上の群の雄で胸腺重量の低下が，雌雄で脾臓重量の低下が認められた。1200 mg/kg/日群の雌で卵巣及び子宮重量の低下が認められた。病理組織学的検査では，200 mg/kg/日以上の群の雄及び 600 mg/kg/日以上の群の雌で腎臓の傍糸球体細胞の限局性肥大／過形成，胸腺のリンパ減少が，50 mg/kg/日以上の群で時に巣状の粘膜びらん及び限局性出血を伴う腺胃の混合細胞型炎症，1200 mg/kg/日群の雄及び 200 mg/kg/日以上の群の雌で脾臓のリンパ球の減少，1200 mg/kg/日群の雌雄で盲腸の拡張が認められた。

トキシコキネティクスでは，AHU 及び VAL は経口投与後速やかに吸収され，AHU はすぐに LBQ に変換された。AHU，LBQ 及び VAL の用量に依存した曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，すべての LCZ 投与群で体重増加の抑制，網状赤血球数の減少及び胃の病理組織学的変化が認められたことから，本試験では無毒性量は設定できなかった。

**Table 3-3　　ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 50 | 雄 | 2070 | 206 | 13400 | 2780 | 13000 | 3550 |
| | | 雌 | 2200 | 162 | 11700 | 3270 | 13200 | 3930 |
| | 200 | 雄 | 3940 | 418 | 41200 | 6520 | 62500 | 12000 |
| | | 雌 | 1610 | 772 | 29400 | 8350 | 52000 | 8690 |
| | 600 | 雄 | 4550 | 572 | 70200 | 11800 | 160000 | 18800 |
| | | 雌 | 8580 | 1110 | 122000 | 14200 | 186000 | 26900 |
| | 1200 | 雄 | 22100 | 2080 | 203000 | 19600 | 390000 | 49100 |
| | | 雌 | 12800 | 2610 | 126000 | 29200 | 342000 | 94300 |
| 試験 13 日 | 50 | 雄 | 811 | 163 | 6070 | 4230 | 12100 | 4930 |
| | | 雌 | 594 | 306 | 10500 | 6140 | 20100 | 5990 |
| | 200 | 雄 | 1410 | 786 | 41100 | 14300 | 90100 | 19600 |
| | | 雌 | 1910 | 1510 | 54400 | 20500 | 74700 | 12900 |
| | 600 | 雄 | 5600 | 2330 | 112000 | 36700 | 247000 | 32800 |
| | | 雌 | 4720 | 1270 | 193000 | 27900 | 299000 | 28500 |
| | 1200 | 雄 | 9450 | 1810 | 315000 | 35300 | 562000 | 43100 |
| | | 雌 | 12200 | 1400 | 222000 | 28500 | 379000 | 36000 |

Source: Table 2.6.7.6A-0670220

単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.1.4 ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験（追加試験）

本試験 [Table 2.6.7.6A-0670468] は，低用量の LCZ の 2 週間反復経口投与によりラットで発現する毒性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，10 及び 30 mg/kg/日の用量で 2 週間経口投与した。

本薬投与に関連した死亡はみられず，一般状態，体重，摂餌量，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査，剖検，器官重量，病理組織学的検査において異常は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，LBQ 及び VAL の用量の増加に伴う曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は 30 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-4 ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験（追加試験）における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 10 | 雄 | NC | NA | 3440 | 1050 | 5440 | 1170 |
| | | 雌 | NC | NA | 2390 | 1020 | 4020 | 939 |
| | 30 | 雄 | 71.9 | 58.6 | 7120 | 3760 | 13200 | 3940 |
| | | 雌 | 57.3 | 35.6 | 8070 | 2300 | 11800 | 2190 |
| 試験 13 日 | 10 | 雄 | NC | NA | 2350 | 1410 | 4950 | 1750 |
| | | 雌 | NC | NA | 2490 | 1150 | 3950 | 1250 |
| | 30 | 雄 | 56.3 | 88.5 | 6310 | 3760 | 10700 | 3710 |
| | | 雌 | 48.6 | 49.1 | 5420 | 4550 | 11500 | 3580 |

Source: Table 2.6.7.6A-0670468
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL
NA = Not applicable; NC = Not calculated

### 3.1.5 ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7B-0670283] は，LCZ の 13 週間反復経口投与によりラットで発現する毒性及びその回復性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の Wistar 系ラットに，0.5%CMC 液に懸濁した LCZ を 0，10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。1 群雌雄各 6 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 4 週間の休薬により回復性について検討した。

本薬投与に関連した死亡はみられず，一般状態の異常も認められなかった。体重増加の抑制及び平均体重の低値，並びに摂餌量の低下が 100 mg/kg/日群で認められた。眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学的検査及び尿検査では，本薬投与に関連した異常は認められなかった。

剖検では，本薬投与に関連した異常は認められなかった。器官重量の変化として，100 mg/kg/日群の雌雄で心臓重量の低値がみられたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。病理組織学的検査では，100 mg/kg/日群の雌雄で腺胃の混合細胞型炎症が認められた。いずれの変化も 4 週間の回復性試験終了時には認められなかった。

トキシコキネティクスでは，LBQ 及び VAL の用量の増加に伴う曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，体重，摂餌量，器官重量及び胃の病理組織学的変化が認められたことから，無毒性量は 30 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-5　　ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 10 | 雄 | NC | 16.5 | 2670 | 1130 | 6210 | 1690 |
| | | 雌 | NC | 16.7 | 1830 | 1330 | 3950 | 1820 |
| | 30 | 雄 | NC | 41.7 | 6290 | 2840 | 17000 | 3440 |
| | | 雌 | NC | 38.2 | 4490 | 1430 | 12600 | 2030 |
| | 100 | 雄 | 363 | 239 | 22800 | 9710 | 47800 | 12300 |
| | | 雌 | 351 | 143 | 23600 | 4670 | 46600 | 9080 |
| 試験 76 日 | 10 | 雄 | NC | 10.0 | 2110 | 1650 | 4840 | 1990 |
| | | 雌 | NC | 15.9 | 1470 | 1480 | 3170 | 1290 |
| | 30 | 雄 | NC | 19.0 | 5160 | 1900 | 11500 | 3440 |
| | | 雌 | NC | 11.9 | 4800 | 1520 | 10300 | 1900 |
| | 100 | 雄 | 345 | 219 | 36300 | 12800 | 53500 | 8660 |
| | | 雌 | 291 | 126 | 19300 | 5740 | 32600 | 5640 |

Source: Table 2.6.7.7B-0670283
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL
NA = Not applicable; NC = Not calculated

### 3.1.6　　ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7C-0670620] は，LCZ の 26 週間反復経口投与によりラットで発現する毒性及びその回復性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 20 例の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で 26 週間経口投与した。媒体対照群及び高用量群では，1 群雌雄各 10 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 4 週間の休薬により回復性について検討した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態の変化として，10 mg/kg/日以上の群で接触に対する感受性亢進，30 mg/kg/日以上の群で自発運動の増加が用量依存的にみられ，さらに 100 mg/kg/日群の一部の個体で立毛，腹部膨満及び円背位が認められた。平均体重の低下が 100 mg/kg/日群の雄で，体重増加の抑制が 10 mg/kg/日以上の群の雄及び 100 mg/kg/日群の雌で認められた。摂餌量の減少が 100 mg/kg/日群の雄で認められた。回復性試験終了時にも体重の低値が認められた。眼科学的検査では，本薬投与に関連した異常は認められなかった。

血液学的検査，血液生化学的検査及び尿検査では，本薬投与に関連した変化は認められなかった。

剖検では，100 mg/kg/日群の雄 1 例で腺胃に赤色巣が認められた。器官重量の変化として，100 mg/kg/日群の雌雄で心臓重量の低値が認められた。病理組織学的検査では，100 mg/kg/日群の雌雄で腺胃の混合細胞型炎症及び軽微から軽度のびらんが認められた。

トキシコキネティクスでは，LBQ 及び VAL の用量に依存した曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，10 及び 30 mg/kg/日群でみられた一般状態及び体重の変化はいずれも軽微であり，いずれの器官においても病理組織学的変化が認められなかったことから，本試験の無毒性量は 30 mg/kg/日群と考えられた。

**Table 3-6　　ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 10 | 雄 | 18.8 | 15.4 | 1630 | 1190 | 3210 | 1250 |
| | | 雌 | 12.4 | 10.8 | 1170 | 1160 | 2710 | 1430 |
| | 30 | 雄 | 29.9 | 28.6 | 5300 | 1770 | 12400 | 2610 |
| | | 雌 | NC | 41.2 | 3410 | 3540 | 6220 | 4210 |
| | 100 | 雄 | 374 | 202 | 24700 | 9400 | 47200 | 9600 |
| | | 雌 | 184 | 128 | 11200 | 4250 | 31200 | 6250 |
| 試験 150 日 | 10 | 雄 | NC | 7.70 | 1620 | 1360 | 2710 | 1110 |
| | | 雌 | NC | 7.25 | 1730 | 1830 | 2240 | 1440 |
| | 30 | 雄 | 15.3 | 12.6 | 3620 | 1600 | 8650 | 1240 |
| | | 雌 | 74.4 | 61.7 | 6720 | 4140 | 7560 | 3080 |
| | 100 | 雄 | 253 | 87.2 | 14700 | 4930 | 28400 | 4660 |
| | | 雌 | 239 | 206 | 15700 | 10600 | 25900 | 5060 |

Source: Table 2.6.7.7C-0670620
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL
NC = Not calculated

### 3.1.7　　サルを用いた 1 週間反復経口投与用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.6A-0670259] は，LCZ の 1 週間反復経口投与によりカニクイザルで発現する毒性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 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/日の用量で 1 週間経口投与した。

本薬投与に関連した死亡はみられず，一般状態，体重，摂餌量及び心電図への影響も認められなかった。血液学的検査，血液生化学的検査及び尿検査では，本薬投与に関連した異常は認められなかった。器官重量への影響はみられず，剖検及び病理組織学的検査で異常は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，LBQ 及び VAL の用量の増加に伴う曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，本薬投与に関連した変化はみられず，無毒性量は 100 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-7　　サルを用いた 1 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 25 | 雄 | 6440 | 2810 | 31700 | 8750 | 5700 | 1160 |
| | | 雌 | 3710 | 2030 | 29800 | 16300 | 5300 | 876 |
| | 100 | 雄 | 27500 | 13600 | 180000 | 45100 | 16900 | 2750 |

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| | | 雌 | 31000 | 12700 | 147000 | 45000 | 17100 | 2180 |

Source: Table 2.6.7.6A-0670259
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.1.8 サルを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.6A-0670276] は，LCZ の 2 週間反復経口投与によりカニクイザルで発現する毒性及びその回復性を検討することを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 1 例（600 mg/kg/日群は雌雄各 2 例）のカニクイザルに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，50，100，300 及び 600 mg/kg/日の用量で 2 週間経口投与した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態の変化として，300 mg/kg/日以上の群で軟便，下痢及び嘔吐が，600 mg/kg/日群では，粘液便，体温低下，蒼白及び削痩が認められた。体重の低下が 300 mg/kg/日群の雌及び 600 mg/kg/日群の雌雄で，摂餌量の減少が 600 mg/kg/日群で認められた。

血液学的検査では，600 mg/kg/日群で網状赤血球数の軽微から中等度の減少がみられた。血液生化学的検査では，600 mg/kg/日群の雌雄各 1 例で BUN 及びクレアチニンの中等度の増加が認められた。

剖検及び器官重量に，本薬投与に関連した異常は認められなった。病理組織学的検査では，600 mg/kg/日群の雌雄で腎臓の尿細管上皮細胞の好塩基性化，空胞化又は単細胞壊死がみられ，傍糸球体細胞の軽微な肥大も認められた。

トキシコキネティクスでは，AHU，LBQ 及び VAL の用量比を上回る曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験の無毒性量は雄で 300 mg/kg/日，雌で 100 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-8 サルを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 14 日 | 50 | 雄 | 7950 | 2010 | 70000 | 16700 | 8110 | 1090 |
| | | 雌 | 15000 | 2980 | 88800 | 19600 | 8980 | 1260 |
| | 100 | 雄 | 38300 | 13500 | 233000 | 51700 | 35200 | 2300 |
| | | 雌 | 50100 | 23400 | 284000 | 68900 | 14200 | 2440 |
| | 300 | 雄 | 258000 | 105000 | 1100000 | 299000 | 157000 | 46900 |
| | | 雌 | 181000 | 42500 | 1220000 | 162000 | 98100 | 16500 |
| | 600 | 雄 | 778000 | 174000 | 4010000 | 355000 | 488000 | 136000 |
| | | 雌 | 269000 | 37100 | 2990000 | 215000 | 274000 | 43200 |

Source: Table 2.6.7.6A-0670276
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.1.9 サルを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7D-0670282] は，LCZ の 13 週間反復経口投与によりカニクイザルで発現する毒性及びその回復性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 3 例のカニクイザルに，0.5%CMC 液に懸濁した LCZ を 0，30，100 及び 300 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。媒体対照群及び高用量群では，1 群雌雄各 2 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 4 週間の休薬により回復性について検討した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態の変化として，30 mg/kg/日以上の群の雄及び 100 mg/kg/日以上の群の雌で軟便及び下痢がみられ，300 mg/kg/日群では粘液便が認められた。30 mg/kg/日以上の群の雄及び 300 mg/kg/日群の雌では嘔吐が認められた。体重増加の抑制が，100 mg/kg/日以上の群の雄及び 300 mg/kg/日群の雌で認められた。摂餌量の変化はみられず，眼科学的検査及び心電図検査では本薬投与に関連した異常は認められなかった。

臨床検査では，300 mg/kg/日群の雌 1 例で赤血球パラメータの低下，BUN 及びクレアチニンの増加がみられたが，他の個体で検査値の異常は認められなかった。

剖検及び器官重量に本薬投与に関連した異常は認められなかった。病理組織学的検査では，300 mg/kg/日群の雌雄で腎臓の傍糸球体細胞の肥大が認められた。さらに，300 mg/kg/日群の雌 1 例（no. 4501）では，好塩基性尿細管，尿細管萎縮，糸球体嚢線維化も観察された。

トキシコキネティクスでは，LBQ 及び VAL の用量の増加に伴う曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は 30 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-9 サルを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 30 | 雄 | 6590 | 3710 | 47700 | 18000 | 7900 | 1310 |
| | | 雌 | 6450 | 5800 | 35800 | 17200 | 8540 | 1700 |
| | 100 | 雄 | 24500 | 8300 | 189000 | 53900 | 29200 | 6250 |
| | | 雌 | 40100 | 16000 | 146000 | 40300 | 15200 | 3260 |
| | 300 | 雄 | 126000 | 42400 | 687000 | 129000 | 97700 | 30000 |
| | | 雌 | 134000 | 49200 | 551000 | 126000 | 78300 | 21700 |
| 試験 73 日 | 30 | 雄 | 5990 | 4920 | 37800 | 17600 | 5650 | 1170 |
| | | 雌 | 5760 | 4020 | 34000 | 17700 | 4920 | 1110 |
| | 100 | 雄 | 24600 | 11900 | 176000 | 47400 | 20500 | 2990 |
| | | 雌 | 34500 | 15500 | 146000 | 48300 | 12500 | 3140 |
| | 300 | 雄 | 147000 | 96000 | 748000 | 183000 | 74900 | 33400 |
| | | 雌 | 154000 | 71200 | 894000 | 186000 | 70300 | 16200 |

Source: Table 2.6.7.7D-0670282
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.1.10 サルを用いた 39 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7E-0670621] は，LCZ の 39 週間反復経口投与によりカニクイザルで発現する毒性及びその回復性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 4 例のカニクイザルに，0.5%CMC 液に懸濁した LCZ を 0，30，100 及び 300 mg/kg/日の用量で 39 週間経鼻胃投与した。媒体対照群及び高用量群では，1 群雌雄各 2 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 4 週間の休薬により回復性について検討した。さらに，Aβ への影響に関する検討の一環として，対照群及び高用量群の脳について免疫組織化学検査及び特殊染色（ビルショウスキー染色）による追加検査を実施した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。対照群の雌 1 例では，原因不明の出血を伴う血小板減少及び血管外溶血性貧血が認められた。300 mg/kg/日群の雄 1 例の死亡は，投与過誤が原因と考えられた。生存例の一般状態，体重及び心電図への影響はみられず，眼科学的検査でも異常は認められなかった。

血液学的検査では，300 mg/kg/日群で赤血球パラメータの低下，網状赤血球数の減少が認められた。血液生化学的検査では，300 mg/kg/日群で BUN の増加が認められた。尿検査では，本薬投与に関連した異常は認められなかった。器官重量への影響はみられず，剖検で異常は認められなかった。病理組織学的検査では，100 mg/kg/日以上の群で腎臓の傍糸球体細胞の肥大・過形成が認められた。4 週間の休薬期間終了後，300 mg/kg/日群の雄では傍糸球体細胞の肥大・過形成の回復傾向がみられたが，雌では回復性が認められなかった。

脳における追加病理組織学的検査の結果，LCZ 投与に関連した Aβ(1-42) の沈着及びアミロイド斑の形成は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，LBQ 及び VAL の用量の増加に伴う曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は 30 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-10 サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 30 | 雄 | 4650 | 2310 | 29300 | 11400 | 4970 | 781 |
| | | 雌 | 3130 | 1340 | 26500 | 7940 | 4820 | 1450 |
| | 100 | 雄 | 19100 | 11000 | 117000 | 38900 | 13900 | 4980 |
| | | 雌 | 23000 | 14800 | 140000 | 55300 | 15600 | 5580 |
| | 300 | 雄 | 123000 | 51800 | 673000 | 117000 | 84900 | 34000 |
| | | 雌 | 121000 | 46400 | 551000 | 102000 | 77100 | 28100 |
| 試験 272 日 | 30 | 雄 | 2640 | 1270 | 30300 | 8680 | 9990 | 813 |
| | | 雌 | 2000 | 1020 | 24100 | 6680 | 7010 | 825 |
| | 100 | 雄 | 20800 | 13100 | 148000 | 44600 | 29100 | 2900 |
| | | 雌 | 20100 | 11700 | 156000 | 48500 | 46200 | 4270 |
| | 300 | 雄 | 93400 | 36900 | 659000 | 141000 | 69800 | 9330 |
| | | 雌 | 111000 | 38300 | 569000 | 146000 | 65200 | 10600 |

Source: Table 2.6.7.7E-0670621

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |

単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

## 3.2 AHU

### 3.2.1 マウスを用いた 5 日間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.6B-0670138] は，AHU を経口投与した ICR 系マウスにおける毒性評価及び反復投与試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雄 10 例の ICR 系マウスに，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を 0，1000 及び 1500 mg/kg/日の用量で 5 日間経口投与した。

1500 mg/kg/日群の 2 回目の投与後に 1 例が死亡した。死亡前の一般状態の変化として，努力性呼吸，腹部膨満，下腹部の汚れ，糞量減少，体温低下，自発運動の低下，眼脂が認められた。

剖検では，1500 mg/kg/日群の 4 例に胃の拡張がみられ，1 例では盲腸の拡張も認められた。死亡例では肺の拡張が認められた。

1000 mg/kg/日群では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。

### 3.2.2 B6C3F1 系マウスを用いた 1 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.6B-0670159] は，AHU を経口投与した B6C3F1 系マウスにおける毒性評価及び反復投与試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 5 例の B6C3F1 系マウスに，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を 0，500 及び 750 mg/kg/日の用量で 7 日間経口投与した。

本試験では，死亡，剖検所見及び体重への影響は認められなかった。AHU 投与に関連した一般状態の変化として，糞量減少が 500 mg/kg/日群の雌 1 例及び 750 mg/kg/日群の雌 2 例に認められた。

以上のとおり，B6C3F1 系マウスに 750 mg/kg/日までの用量で 7 日間経口投与した結果，良好な忍容性が認められた。

### 3.2.3 マウスを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.6B-0570150] は，AHU を経口投与した ICR 系マウスにおける毒性評価及び反復投与試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 5 例の ICR 系マウスに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，250，500 及び 1500 mg/kg/日の用量で 2 週間経口投与した。

AHU 投与に関連した死亡は認められなかった。1500 mg/kg/日群の雌 1 例を，投与過誤による一般状態の不良がみられたため安楽死処分した。一般状態，体重及び摂餌量に，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

血液学的検査では，500 mg/kg/日以上の群の雌雄で赤血球系パラメータの低下が，1500 mg/kg/日群の雌では平均赤血球容積及び網状赤血球数の増加が認められた。血液生化学的検査では，250 mg/kg/日以上の群の雌で，アラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase，ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase，AST）の上昇がみられた。

剖検では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。器官重量の変化として，1500 mg/kg/日群で脾臓重量の増加がみられ，赤血球系パラメータの減少に伴う脾臓における造血亢進との関連性が推察された。

トキシコキネティクスでは，AHU 及び LBQ の用量比を上回る曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験の無作用量は雄では 250 mg/kg/日，雌では 250 mg/kg/日未満と考えられた。

**Table 3-11　　マウスを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 14 日 | 250 | 雄 | 1150 | 1060 | 42300 | 29800 |
| | | 雌 | 4010 | 5100 | 66700 | 84400 |
| | 500 | 雄 | 15500 | 1900 | 256000 | 37300 |
| | | 雌 | 29300 | 20900 | 277000 | 204000 |
| | 1500 | 雄 | 121000 | 70700 | 2190000 | 324000 |
| | | 雌 | 265000 | 30200 | 1690000 | 335000 |

Source: Table 2.6.7.6B-0570150
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.2.4　　ラットを用いた 1 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.6B-0370107] は，AHU を経口投与した Wistar 系ラットにおける毒性評価及び反復投与試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 5 例の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，50，250 及び 1000 mg/kg/日の用量で 1 週間経口投与した。

1000 mg/kg/日群の雄 1 例を一般状態不良のため，試験 7 日に安楽死処分した。病理組織学的検査では，腺胃のびらん，前胃の過形成及び角化亢進，並びに胸腺のリンパ減少が認められたが，瀕死状態を呈した原因を明らかにすることはできなかった。

一般状態の変化として，250 mg/kg/日群の雄で赤色鼻汁及び口腔周囲被毛の赤色の汚れがみられ，1000 mg/kg/日群の雌雄では下腹部の汚れ，脱水，自発運動減少，異常呼吸音（ラ音），努力性呼吸も認められた。体重及び摂餌量の低下が 1000 mg/kg/日群の雌雄でみられた。

血液学的検査では AHU 投与に関連した変化は認められなかった。血液生化学的検査では，ALT の上昇が 1000 mg/kg/日群の雄で認められた。

剖検では AHU 投与に関連した異常は認められなかった。器官重量の変化として，250 mg/kg/日群の雄及び 1000 mg/kg/日群の雌雄で，胸腺重量の低下が認められた。病理組織学的検査では，50 mg/kg/日以上の群で胸腺のリンパ球減少及び前胃の角化亢進及び過形成，250 mg/kg/日以上の群で腺胃のびらん，1000 mg/kg/日群の雄 1 例では前胃の潰瘍が認められた。

トキシコキネティクスでは，AHU の用量に比例した LBQ の曝露量の増加が認められた。先に実施した試験の結果を考慮して，AHU の濃度は測定しなかった。

以上のとおり，すべての群で病理組織学的変化がみられたため無毒性量は設定できなかった。

**Table 3-12　　ラットを用いた 1 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | LBQ | |
|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 50 | 雄 | 21200 | 6270 |
| | | 雌 | 21500 | 4710 |
| | 250 | 雄 | 115000 | 28800 |
| | | 雌 | 98600 | 15100 |
| | 1000 | 雄 | 304000 | 28500 |
| | | 雌 | 241000 | 43600 |

Source: Table 2.6.7.6B-0370107
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.2.5　　ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.6B-0470084] は，AHU を経口投与した Wistar 系ラットにおける毒性評価及び反復投与試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，10，50 及び 150 mg/kg/日の用量で 2 週間経口投与した。

本試験で死亡はみられず，AHU 投与に関連した一般状態，体重及び摂餌量の変化はみられず，眼科学的検査では異常は認められなかった。

血液学的検査及び尿検査では異常はみられなかった。血液生化学的検査では，50 mg/kg/日群の雄及び 150 mg/kg/日群の雌雄でトリグリセリドの軽度の減少か認められた。

剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，すべての AHU 群で AHU 及び LBQ への曝露がみられたが，10 及び 50 mg/kg/日群では投与 1 又は 2 時間後のみで AHU が検出された。AHU の用量に比例した LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は 150 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-13　　ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 10 | 雄 | NC | NA | 2970 | 1700 |
| | | 雌 | NC | NA | 3570 | 1630 |
| | 50 | 雄 | NC | NA | 12900 | 7070 |
| | | 雌 | NC | NA | 13200 | 7270 |
| | 150 | 雄 | 4130 | 894 | 78100 | 14700 |
| | | 雌 | 968 | 817 | 29100 | 10500 |
| 試験 15 日 | 10 | 雄 | NC | NA | 2560 | 1990 |
| | | 雌 | NC | NA | 2940 | 1790 |
| | 50 | 雄 | NC | NA | 27800 | 8220 |
| | | 雌 | NC | NA | 16500 | 9790 |
| | 150 | 雄 | 1310 | 383 | 82500 | 22700 |
| | | 雌 | 2630 | 497 | 81300 | 10300 |

Source: Table 2.6.7.6B-0470084
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL
NA = Not applicable; NC = Not calculated

## 3.2.6　　ラットを用いた 2 週間反復経口投与毒性試験（追加試験）

本試験 [Table 2.6.7.6B-0670107] は，AHU を経口投与した Wistar 系ラットにおける毒性評価及び反復投与試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の Wistar 系ラットに，50 mM リン酸緩衝液（pH8.8±0.1）に懸濁した AHU を 0，250，500，1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で 2 週間経口投与した。

AHU 投与に関連した死亡・瀕死が，1000 mg/kg/日群の雌 2 例，2000 mg/kg/日群の雄 2 例，雌 1 例に認められた。死亡・瀕死例の病理組織学的検査では，陰嚢表皮，胃腸管粘膜，又は呼吸上皮細胞でアポトーシス／壊死がみられ，不顕性細菌のコロニー形成によるものと考えられる致死性のフィブリン及び壊死性細胞残屑による気管の偽膜性閉塞が認められた。2000 mg/kg/日群の雌 1 例では，一般状態の変化として腹部膨満がみられ，剖検ではガス貯留による胃腸管拡張が，病理組織学的検査では胃内腔拡張及び二次的な壁の菲薄化が認められた。

一般状態の変化として，500 mg/kg/日以上の群で被毛の汚れ，1000 mg/kg/日以上の群でごく軽度の自発運動低下，赤色鼻汁，糞量減少，流涎，異常呼吸（努力性呼吸，ラ音，喘ぎ）がみられ，浅呼吸，呼吸数増加又は腹部膨満がそれぞれ雌 1 例に認められた。1000 mg/kg/日以上の群の雄で体重及び摂餌量の低下が認められた。

血液学的検査及び血液生化学的検査では，AHU 投与に関連した変化はみられなかった。

剖検では，胃のガス貯留による拡張が 1000 又は 2000 mg/kg/日群の雌各 1 例に認められた。器官重量の変化として，1000 mg/kg/日以上の群の雄で副腎重量の増加がみられた。病理組織学的検査では，2000 mg/kg/日群の雄で副腎皮質の過形成が認められた。

トキシコキネティクスでは，用量増加に伴う AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は 250 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-14　　ラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 250 | 雄 | 3040 | 300 | 42100 | 9080 |
| | | 雌 | 8620 | 2630 | 29900 | 5960 |
| | 500 | 雄 | 115000 | 141000 | 133000 | 11500 |
| | | 雌 | 37700 | 3280 | 109000 | 21700 |
| | 1000 | 雄 | 41800 | 11200 | 198000 | 20300 |
| | | 雌 | 40200 | 6910 | 126000 | 23300 |
| | 2000 | 雄 | 61000 | 18000 | 341000 | 39000 |
| | | 雌 | 261000 | 31200 | 376000 | 35900 |
| 試験 11 日 | 250 | 雄 | 7740 | 2320 | 135000 | 22600 |
| | | 雌 | 3810 | 1160 | 70100 | 7600 |
| | 500 | 雄 | 8350 | 1200 | 132000 | 13000 |
| | | 雌 | 18700 | 3030 | 144000 | 11300 |
| | 1000 | 雄 | 9100 | 1500 | 218000 | 47800 |
| | | 雌 | 26200 | 1650 | 146000 | 11900 |
| | 2000 | 雄 | 217000 | 259000 | 683000 | 94100 |
| | | 雌 | 17900 | 3320 | 103000 | 19000 |

Source: Table 2.6.7.6B-0670107
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.2.7　　ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7F-0570207] は，AHU の 13 週間反復経口投与によりラットで発現する毒性及びその回復性を検討すること，並びにがん原性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，50，100，200 及び 400 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。

AHU 投与に関連した死亡はみられず，一般状態，体重及び摂餌量への影響は認められなかった。眼科学的検査では異常は認められなかった。

血液学的検査では，好中球数の増加が 200 mg/kg/日以上の群の雄で認められた。血液生化学的検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。

器官重量の変化として，甲状腺重量の低下が 100 mg/kg/日以上の群の雌及び 400 mg/kg/日群の雄でみられたが，剖検及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，AHU の用量増加に伴う AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。AHU の反復投与による AHU 及び LBQ の曝露量の蓄積は認められなかった。

以上のことから，本試験における無毒性量は 400 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-15　　ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 50 | 雄 | 308 | 104 | 23500 | 6790 |
| | | 雌 | 164 | 109 | 16000 | 5420 |
| | 100 | 雄 | 1250 | 172 | 67600 | 10200 |
| | | 雌 | 1410 | 301 | 41100 | 8250 |
| | 200 | 雄 | 2400 | 329 | 106000 | 9510 |
| | | 雌 | 2630 | 698 | 98900 | 16900 |
| | 400 | 雄 | 5430 | 1760 | 173000 | 41300 |
| | | 雌 | 6360 | 1980 | 135000 | 37200 |
| 試験 76 日 | 50 | 雄 | 212 | 107 | 22300 | 8300 |
| | | 雌 | 111 | 123 | 16800 | 5660 |
| | 100 | 雄 | 861 | 159 | 73800 | 16300 |
| | | 雌 | 1140 | 256 | 48400 | 10200 |
| | 200 | 雄 | 2030 | 300 | 164000 | 23200 |
| | | 雌 | 3530 | 875 | 171000 | 29700 |
| | 400 | 雄 | 5590 | 2860 | 255000 | 86300 |
| | | 雌 | 6060 | 1800 | 344000 | 71300 |

Source: Table 2.6.7.7F-0570207
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.2.8　　ラットを用いた 4 及び 13 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7G-0770711] は，AHU の 13 週間反復経口投与によりラットで発現する毒性及びその回復性を検討すること，並びにがん原性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 22 例の Wistar 系ラットに，0.5% ヒドロキシプロピルセルロース（hydroxypropyl cellulose，HPC）液に懸濁した AHU を 0，400，800 及び 1200 mg/kg/日の用量で 4 週間又は 13 週間経口投与した。1 群雌雄各 6 例については中間検査群として 4 週間の投与期間終了時に，1 群雌雄各 10 例については 13 週間の投与期間終了時に各種検査を行い，1 群雌雄各 6 例については回復性試験群として 13 週間の投与期間終了後 4 週間の休薬により回復性について検討した。

1200 mg/kg/日群の雌 1 例（動物番号：4510）が試験 23 日に死亡し，800 mg/kg/日群の雄 1 例（動物番号：3010）及び 1200 mg/kg/日群の雌 3 例（動物番号：4518，4503 及び 4504）を一般状態不良のため安楽死処分した。1200 mg/kg/日群の雌 1 例（動物番号：4518）は投与過誤によるものと判断された。800 mg/kg/日群の雄 1 例（動物番号：3010），1200 mg/kg/日群の雌 2 例（動物番号：4503 及び 4504）については，本薬投与との直接の関連性を示す病理組織学的変化はみられず，一般状態不良の原因は明らかではなかったものの，被験液の気道流入または切歯の破折が原因となった可能性を否定できないことから，被験物質に起因した変化とは判断しなかった。しかしながら，1200 mg/kg/日群で死後発見された雌 1 例（動物番号：4510）に関してはその死因は明らかではなく，AHU 投与との関連性は否定できなかった。生存例の一般状態の変化として，

800 mg/kg/日以上の群の雄で円背位，粗毛，自発運動低下，立毛，1200 mg/kg/日群の雄で口周囲赤色物質付着，800 mg/kg/日以上の群の雌で腹部膨満，円背位，立毛，1200 mg/kg/日群の雌で自発運動低下，下腹部の汚れ，800 mg/kg/日以上の群で投与に対する抵抗及び投与液の逆流を示す個体の増加がみられた。投与が困難な個体の一部では，投与後の一般状態の変化として自発運動減少，鼻汁，円背位，下腹部の汚れ，攻撃性，鼻腔周囲赤色物質付着，流涎が認められた。体重増加の抑制及び平均体重の低値が 400 mg/kg/日以上の群の雄で認められた。摂餌量の減少が800 mg/kg/日以上の群の雄及び 1200 mg/kg/日群の雌で認められた。

中間検査（4 週間投与終了）では，血液学的検査及び血液生化学的検査において AHU 投与に関連した変化は認められなかった。13 週間の投与終了時の血液学的検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。血液生化学的検査では，400 mg/kg/日以上の群の雌，800 mg/kg/日以上の群の雄で ALT の軽微な上昇がみられたが，関連する病理組織学的変化が認められなかったことから，毒性学的意義は低いものと考えられた。

剖検では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。器官重量の変化として，中間検査では 400 mg/kg/日以上の群の雄で，投与期間終了時検査では 800 mg/kg/日以上の群の雄で，心臓重量の低値がみられたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，用量増加に伴う AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，1200 mg/kg/日群でみられた 1 例の死亡を除き，1200 mg/kg/日までの忍容性が認められた。しかしながら，1200 mg/kg/日群でみられた一般状態の悪化，体重及び摂餌量の減少を考慮して，本試験条件下における最大耐量は 800 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-16　　ラットを用いた 4 及び 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 400 | 雄 | 6310 | 597 | 170000 | 20300 |
| | | 雌 | 4220 | 377 | 132000 | 10800 |
| | 800 | 雄 | 9570 | 804 | 246000 | 26100 |
| | | 雌 | 7260 | 1260 | 161000 | 26600 |
| | 1200 | 雄 | 13100 | 1680 | 422000 | 33800 |
| | | 雌 | 10500 | 1440 | 356000 | 26900 |
| 試験 72 日 | 400 | 雄 | 9710 | 2370 | 266000 | 53900 |
| | | 雌 | 5610 | 1850 | 214000 | 74500 |
| | 800 | 雄 | 11900 | 2510 | 304000 | 46800 |
| | | 雌 | 24500 | 3320 | 475000 | 71200 |
| | 1200 | 雄 | 39500 | 4350 | 807000 | 78700 |
| | | 雌 | 24600 | 2390 | 739000 | 115000 |

Source: Table 2.6.7.7G-0770711

単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.2.9 ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7H-1370484] は，AHU の 26 週間反復経口投与によりラットで発現する毒性及びその回復性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 20 例の Wistar 系ラットに，0.5% HPC 液に懸濁した AHU を 0，50，150 及び 600 mg/kg/日の用量で 26 週間経口投与した。対照群及び高用量群の雌雄各 10 例については回復性試験群として投与期間終了後 4 週間の休薬により回復性について検討した。

本試験では瀕死／死亡例は認められなかった。一般状態の変化として，600 mg/kg/日群の雌雄で流涎が認められた。体重増加の抑制が 600 mg/kg/日群の雌雄で認められた。摂餌量，眼科学的検査，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，剖検，器官重量，病理組織学的検査では，本薬投与の影響は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，用量増加に比例的な AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，600 mg/kg/日群で流涎及び体重増加の抑制がみられたが，臨床検査値の変動及び病理学的変化は認められず，忍容性は良好であった。したがって，本試験の無毒性量は 600 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-17 ラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 50 | 雄 | 309 | 148 | 25900 | 5000 |
| | | 雌 | 215 | 87 | 17500 | 4860 |
| | 150 | 雄 | 543 | 302 | 36800 | 12000 |
| | | 雌 | 3610 | 300 | 100000 | 12000 |
| | 600 | 雄 | 6510 | 2330 | 167000 | 51400 |
| | | 雌 | 5670 | 1000 | 167000 | 36200 |
| 試験 149 日 | 50 | 雄 | 294 | 151 | 27100 | 6320 |
| | | 雌 | 301 | 189 | 35900 | 12300 |
| | 150 | 雄 | 2310 | 803 | 108000 | 42600 |
| | | 雌 | 3830 | 627 | 205000 | 35500 |
| | 600 | 雄 | 11800 | 7070 | 341000 | 48000 |
| | | 雌 | 7480 | 2940 | 347000 | 131000 |

Source: Table 2.6.7.7H-1370484
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.2.10 マーモセットを用いた 1 週間反復経口投与用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.7I-0370097] は，AHU の 1 週間反復経口投与によりマーモセットで発現する毒性を検討すること及び実施予定の長期反復投与毒性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 適用（生データ及び報告書のみ）で実施した。1 群雌雄各 2 例のマーモセットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，50，250 及び 500 mg/kg/日の用量で 1 週間経口投与した。

本試験で死亡はみられなかった。一般状態の変化として，250 mg/kg/日以上の群の雌雄で糞便異常（軟便，下痢）がみられ，500 mg/kg/日群の雌雄では嘔吐も認められた。体重及び摂餌量への影響は認められなかった。

血液学的検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。血液生化学的検査では，500 mg/kg/日群の雌雄でアルブミン及び蛋白の低下が認められた。この変化は，嘔吐及び下痢による消化管からの蛋白質低下の二次的影響と考えられた。器官重量への影響はみられず，剖検で異常は認められなかった。病理組織学的検査では，250 mg/kg/日以上の群の雌雄で，胃の上皮細胞空胞化，壁細胞数の減少，副細胞の過形成及び腺拡張が認められ，AHU の刺激性が示唆された。

トキシコキネティクスでは，AHU の用量比を下回る AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，本試験における無毒性量は 50 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-18　　マーモセットを用いた 1 週間反復投与用量設定試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 50 | 雄 | 155000 | 50000 | 59600 | 18000 |
| | | 雌 | 134000 | 79100 | 53400 | 26800 |
| | 250 | 雄 | 302000 | 153000 | 173000 | 61700 |
| | | 雌 | 447000 | 247000 | 312000 | 60700 |
| | 500 | 雄 | 270000 | 136000 | 210000 | 88400 |
| | | 雌 | 647000 | 185000 | 291000 | 92400 |

Source: Table 2.6.7.7I-0370097
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 3.2.11　マーモセットを用いた 52 週間反復経口投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.7J-0570307] は，AHU の 52 週間反復経口投与によりマーモセットで発現する毒性及びその回復性を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 5 例のマーモセットに，0.5% CMC 液に懸濁した AHU を 0，25，100 及び 200 mg/kg/日の用量で 52 週間経口投与した。媒体対照群及び高用量群では，1 群雌雄各 2～4 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 4 週間の休薬により回復性について検討した。

本試験では死亡は認められなかった。25 及び 100 mg/kg/日群の雄各 1 例で一般状態の不良（削痩，粗毛，脱水，円背位，自発運動低下及び体重減少）が認められたため安楽死処分した。症状の発現に用量反応性がみられず，AHU 投与に関連した病理組織学的変化が認められなかったことから，投与との関連性は明らかではなかった。一般状態の変化として，100 mg/kg/日以上の群で嘔吐が認められた。体重の低下が 100 mg/kg/日群の雄及び 200 mg/kg/日群の雌の一部の個体で認められた。AHU 投与に関連した摂餌量の変化はみられず，眼科学的検査及び心電図検査では異常は認められなかった。

血液学的検査，血液生化学的検査及び尿検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。

剖検では異常は認められなかった。器官重量の変化として，甲状腺重量の低下が 25 mg/kg/日以上の群の雄で認められた。病理組織学的検査では，対照群の雄 1 例，25 mg/kg/日群の雄 4 例，100 mg/kg/日以上の群の雄全例で甲状腺濾胞のコロイドの減少が認められた。しかしながら，対照群でも観察されていること，炎症性変化又は変性は認められないこと，体重に異常な変動はみられなかったことから，毒性学的意義は低いものと判断した。

トキシコキネティクスでは，AHU の用量に比例した AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験の無毒性量は 25 mg/kg/日と考えられた。

**Table 3-19　　マーモセットを用いた 52 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 25 | 雄 | 57600 | 29100 | 32700 | 19300 |
| | | 雌 | 74100 | 37800 | 59600 | 26000 |
| | 100 | 雄 | 345000 | 153000 | 221000 | 67400 |
| | | 雌 | 294000 | 131000 | 208000 | 62400 |
| | 200 | 雄 | 920000 | 270000 | 685000 | 211000 |
| | | 雌 | 599000 | 193000 | 355000 | 109000 |
| 試験 346 日 | 25 | 雄 | 75200 | 40700 | 34200 | 17100 |
| | | 雌 | 36000 | 9990 | 26600 | 8440 |
| | 100 | 雄 | 266000 | 53500 | 247000 | 66400 |
| | | 雌 | 332000 | 198000 | 193000 | 59600 |
| | 200 | 雄 | 556000 | 236000 | 401000 | 122000 |
| | | 雌 | 694000 | 269000 | 482000 | 137000 |

Source: Table 2.6.7.7J-0570307
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

# 4　遺伝毒性試験

## 4.1　AHU

### 4.1.1　ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験

本試験 [Table 2.6.7.8C-0412008] は，ネズミチフス菌株（TA97a，TA98，TA100，TA102 及び TA1535）を用いた復帰突然変異試験により AHU の遺伝子突然変異誘発性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。

用量設定試験の結果に基づき本試験の用量は，実験 1（プレート法）では 8～5000 µg/plate，実験 2（プレインキュベート法）では 312.5～5000 µg/plate と設定した。いずれの実験も，代謝活性化系存在下及び非存在下で検討した。

試験の結果，いずれの菌株においても，AHU 処理による復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上のことから，本試験条件下において AHU に遺伝子突然変異誘発性はないものと判断した。

### 4.1.2 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験

本試験 [Table 2.6.7.8D-0420038] は，ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験により AHU の染色体異常誘発性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。

分裂指数抑制の結果に基づき本試験の濃度は，実験 1 では代謝活性化系非存在下及び代謝活性化系存在下：33～333 µg/mL（3 時間処理+24 時間回復），実験 2 では代謝活性化系非存在下：100～500 µg/mL（24 時間処理），代謝活性化系存在下：33～333 µg/mL（3 時間処理+24 時間回復）と設定した。

いずれの実験においても，AHU 処理による染色体異常細胞数の増加は認められなかった。

以上のことから，本試験条件下において AHU に染色体異常誘発性はないものと判断した。

### 4.1.3 ラットを用いた骨髄小核試験

本試験 [Table 2.6.7.9B-0412409] は，ラットの骨髄を用いた小核試験により AHU の小核誘発性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雄 7 例の Wistar 系ラットに，1% CMC 液に懸濁した AHU を 0，125，395 及び 1250 mg/kg/日の用量で 2 日間経口投与した。陽性対照群では，雄 3 例の Wistar 系ラットに，生理食塩液に溶解したシクロホスファミドを 10 mg/kg の用量で 2 日間経口投与した。骨髄試料の採取は，すべての投与群で投与 24 時間後に実施した。

いずれの群においても，投与後の一般状態に異常は認められなかった。

AHU 投与群では，最高用量の 1250 mg/kg 群においても小核を有する多染性赤血球数の増加はみられなかった。

以上のことから，本試験条件下において AHU には小核誘発性はないものと考えられた。

## 4.2 LBQ657

### 4.2.1 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験

本試験 [Table 2.6.7.8E-1170562] は，ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験により LBQ の染色体異常誘発性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。

分裂指数抑制の結果に基づき本試験の濃度は，実験 1 では代謝活性化系非存在下：1200～2400 µg/mL（3 時間処理+17 時間回復），代謝活性化系存在下：1200～2800 µg/mL（3 時間処理+17 時間回復），実験 2 では代謝活性化系非存在下：300～1400 µg/mL（20 時間処理），代謝活性化系存在下：1500～3400 µg/mL（3 時間処理+17 時間回復）と設定した。

いずれの実験においても，LBQ 処理による染色体異常細胞数の増加は認められなかった。

以上のことから，本試験条件下において LBQ に染色体異常誘発性はないものと判断した。

## 4.3 VAL

VAL の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験では，VAL の遺伝毒性を示唆する変化は認められなかった（ディオバン錠，20mg，40mg，80mg；製造承認申請資料添付資料ニ-18～21）。

## 4.4 LCZ

### 4.4.1 ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験

本試験 [Table 2.6.7.8A-0612017] は，ネズミチフス菌株（TA97a，TA98，TA100，TA102 及び TA1535）を用いた復帰突然変異試験により LCZ の遺伝子突然変異誘発性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。

用量設定試験の結果に基づき本試験の用量は，実験 1（プレート法）では 8～5000 µg/plate，実験 2（プレインキュベート法）では 312.5～5000 µg/plate，実験 3（プレインキュベート法，TA102 のみ）では 312.5～5000 µg/plate と設定した。いずれの実験も，代謝活性化系存在下及び非存在下で検討した。

試験の結果，いずれの菌株においても，LCZ 処理による復帰突然変異コロニー数の増加は認められなかった。

以上のことから，本試験条件下において LCZ に遺伝子突然変異誘発性はないものと判断した。

### 4.4.2 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験

本試験 [Table 2.6.7.8B-0770050] は，ヒト末梢血リンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験により LCZ の染色体異常誘発性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。

分裂指数抑制の結果に基づき本試験の濃度は，実験 1 では代謝活性化系非存在下：300～1300 µg/mL（3 時間処理+17 時間回復），代謝活性化系存在下：1100～1800 µg/mL（3 時間処理+17 時間回復），実験 2 では代謝活性化系非存在下：100～300 µg/mL（20 時間処理），代謝活性化系存在下：1000～2000 µg/mL（3 時間処理+17 時間回復）と設定した。

いずれの実験においても，LCZ 処理による染色体異常細胞数の増加は認められなかった。

以上のことから，本試験条件下において LCZ に染色体異常誘発性はないものと判断した。

### 4.4.3 ラットを用いた骨髄小核試験

本試験 [Table 2.6.7.9A-0770051] は，ラットの骨髄を用いた小核試験により LCZ の小核誘発性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雄 6 例の Wistar 系ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，500，1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で 2 日間経口投与した。陽性対照群では，雄 6 例の Wistar 系ラットに，生理食塩液に溶解したシクロホスファミドを 20 mg/kg の用量で単回経口投与した。骨髄試料の採取は，すべての投与群で投与 24 時間後に実施した。

いずれの群においても，投与後の一般状態に異常は認められなかった。

LCZ 投与群では，最高用量の 2000 mg/kg 群においても統計学的に有意な小核を有する多染性赤血球数の増加はみられなかった。

以上のことから，本試験条件下において LCZ には小核誘発性はないものと判断した。

# 5 がん原性試験

## 5.1 LCZ

LCZ のがん原性試験は実施しなかった。その理由を以下に示す。

LCZ のマウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験（用量：50，100，200，400 mg/kg/日）では，200 mg/kg/日以上の群で胃の病理組織学的変化（腺胃のびらん，前胃の扁平上皮細胞の過形成及び過角化）が認められた。ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験（用量：10，30，100 mg/kg/日）では，100 mg/kg/日群で腺胃の炎症性細胞浸潤が認められた。より高用量で実施したラットを用いた 2 週間反復投与毒性試験（用量：50，200，600，1200 mg/kg/日）では，腎臓の傍糸球体細胞の肥大及びその二次的変化である赤血球系パラメータの低下，並びに腺胃の炎症を伴うびらんが認められた。これらの変化は用量制限毒性であり，LCZ のマウス及びラットを用いたがん原性試験の高用量には 100 mg/kg/日までの用量を設定することが適切と考えられた。LCZ を 100 mg/kg/日の用量でマウス及びラットに経口投与したときの AHU 及び LBQ の曝露量を推定し，LCZ を 200 mg の用量で 1 日 2 回投与したヒトにおける曝露量と比較した（Table 5-1）。その結果，LCZ を投与したマウス及びラットにおける AHU 及び LBQ の曝露量は，予想臨床用量を投与したヒトにおける曝露量を下回り，がん原性試験で要求される曝露量が得られないことが予測された。一方，LCZ のがん原性試験で設定可能な VAL の高用量は 50 mg/kg/日（LCZ として 100 mg/kg/日）である。この用量は，先に実施した VAL のがん原性試験の高用量より低いことから（マウスでは 31%，ラットでは 25%に相当），LCZ のがん原性試験を実施した場合，VAL の曝露量は，先に実施した VAL のがん原性試験の曝露量を下回るものと考えられた。

以上のことから，LCZ のマウス及びラットを用いたがん原性試験は実施せず，LCZ のがん原性については，AHU のマウス及びラットを用いたがん原性試験，並びに先に実施した VAL のマウス及びラットを用いたがん原性試験の結果を用いて評価することとした。

**Table 5-1 LCZ のがん原性試験における予想曝露量とヒト曝露量との比較**

| 動物種 | LCZ 用量 (mg/kg) | 対応する AHU 用量 (mg/kg) | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h (ng•h/mL)[a] | 曝露量比 [b] | AUC0-24h (ng•h/mL)[a] | 曝露量比 [b] |
| マウス | 100 | 50 | 343 | 0.053 | 8135 | 0.027 |
| ラット | 100 | 50 | 318 | 0.049 | 27800 | 0.092 |

Source: Table 2.6.7.7A-0670524, Table 2.6.7.7B-0670283

a＝マウス（0670524）及びラット（0670283）を用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量（AUC）

b＝200 mg を 1 日 2 回投与したヒト曝露量（A2117 試験及び B2223 試験；AHU; AUC0-12h = 3253 ng·h/mL, LBQ: AUC0-12h = 151611 ng·h/mL）を基に算出

## 5.2 AHU

### 5.2.1 用量設定試験

AHU のがん原性試験のための用量設定試験では，十分な曝露量が得られる適切な投与条件を設定するために，投与方法（経口投与，混餌投与）及び媒体（リン酸緩衝液，0.5% HPC 液）について検討した。マウスを用いた混餌投与による 13 週間反復投与毒性試験の結果，飼料の食べこぼしが多くみられ，十分な曝露量が得られなかったことから，がん原性試験の投与方法には経口投与を選択した。マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験では，0.5% HPC 液を媒体とした場合 1200 mg/kg/日までの用量で忍容性が認められたことから，マウスを用いたがん原性試験の高用量には 1200 mg/kg/日を設定した。ラットでは，4/13 週間反復投与毒性試験の 800 mg/kg/日以上の群で死亡がみられたことから，がん原性試験の高用量には 400 mg/kg/日を設定した。AHU のマウス及びラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験では，LCZ に比較してより高い曝露量が認められ，高用量群においても忍容性が確認された。

**Table 5-2 AHU のがん原性試験における曝露量とヒト曝露量との比較**

| 動物種 | AHU 用量 (mg/kg) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h (ng•h/mL)[a] | 曝露量比 [b] | AUC0-24h (ng•h/mL)[a] | 曝露量比 [b] |
| マウス | 1200 | 雄 | 55000 | 8.5 | 759000 | 2.5 |
| | | 雌 | 33800 | 5.2 | 510000 | 1.7 |
| ラット | 400 | 雄 | 9710 | 1.5 | 266000 | 0.88 |
| | | 雌 | 5610 | 0.86 | 214000 | 0.71 |

Source: Table 2.6.7.10C-0770896，Table 2.6.7.7G-0770711

a = マウス（0770896）及びラット（0770711）を用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量（AUC）

b = 200 mg を 1 日 2 回投与したヒト曝露量（A2117 試験及び B2223 試験；AHU; AUC0-12h = 3253 ng·h/mL, LBQ: AUC0-12h = 151611 ng·h/mL）を基に算出

#### 5.2.1.1 マウスを用いた 1 週間反復投与による媒体検討試験

本試験 [Table 2.6.7.10A-0770781] は，AHU の経口投与による毒性評価において使用する媒体の選択に必要な情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 25 例の ICR 系マウスに，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を 0，400 及び 800 mg/kg/日の用量で，又は 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を 0，400，800 及び 1200 mg/kg/日の用量でそれぞれ 1 週間経口投与した。

死亡発現状況，一般状態，体重及び剖検の結果から，AHU の媒体に 0.5% HPC 液を使用した方が，50 mM リン酸緩衝液使用時に比較して良好な忍容性が認められた。AHU 及び LBQ の曝露量に，媒体による違いは認められなかった。

以上のことから，HPC がリン酸緩衝液よりも媒体として適切と考えられた。

**Table 5-3　　マウスを用いた 1 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 媒体 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| リン酸緩衝液 | 400 | 雄 | 6390 | 3030 | 99100 | 36400 |
| | | 雌 | 9840 | 2570 | 93200 | 30500 |
| | 800 | 雄 | 133000 | 52800 | 884000 | 133000 |
| | | 雌 | 34200 | 22000 | 267000 | 152000 |
| 0.5% HPC | 400 | 雄 | 4940 | 1520 | 100000 | 22900 |
| | | 雌 | 12800 | 8720 | 411000 | 75800 |
| | 800 | 雄 | 14400 | 8900 | 184000 | 114000 |
| | | 雌 | 42500 | 8040 | 421000 | 72800 |
| | 1200 | 雄 | 26100 | 13600 | 533000 | 152000 |
| | | 雌 | 576000 | 217000 | 874000 | 202000 |

Source: Table 2.6.7.10A-0770781
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 5.2.1.2　マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.10A-0770782] は，AHU を経口投与した ICR 系マウスにおける毒性評価を目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の ICR 系マウスに，0.5% HPC 液に懸濁した AHU を 0，200，400，800 及び 1200 mg/kg/日の用量で 4 週間経口投与した。

本試験では死亡はみられなかった。一般状態の変化として，800 mg/kg/日以上の群の一部の個体で腹部膨満が認められた。腹部膨満の発現頻度は媒体に依存しており，リン酸緩衝液に比較して，HPC 液では低頻度であった。体重及び摂餌量の変化はみられず，眼科学的検査，血液学的検査及び血液生化学的検査において AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

器官重量の変化として，200 mg/kg/日以上の群の雌で心臓重量の低下がみられたが，剖検及び病理組織学的検査では AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

以上のことから，本試験における最大耐量及び無毒性量は 1200 mg/kg/日と考えられた。

**Table 5-4　　マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 200 | 雄 | 1440 | 456 | 108000 | 31800 |
| | | 雌 | 2620 | 1540 | 35000 | 20900 |
| | 400 | 雄 | 5920* | 3600 | 177000* | 97000 |
| | | 雌 | 12900 | 15400 | 134000 | 141000 |
| | 800 | 雄 | 36200 | 12400 | 488000 | 164000 |
| | | 雌 | 35100 | 30100 | 440000 | 166000 |
| | 1200 | 雄 | 41500 | 59700 | 640000 | 350000 |
| | | 雌 | 255000 | 33400 | 1990000 | 283000 |

Table 5-4　マウスを用いた 4 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約（続き）

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 29 日 | 200 | 雄 | 720 | 397 | 36000 | 17600 |
| | | 雌 | 7490 | 1670 | 247000 | 87000 |
| | 400 | 雄 | 7200 | 6960 | 102000 | 121000 |
| | | 雌 | 19400* | 12900 | 123000* | 103000 |
| | 800 | 雄 | 18800 | 2200 | 396000 | 59200 |
| | | 雌 | 117000 | 55600 | 1220000 | 305000 |
| | 1200 | 雄 | 53900 | 65600 | 540000 | 361000 |
| | | 雌 | 57100 | 44900 | 427000 | 308000 |

Source: Table 2.6.7.10A-0770782
*1 例の動物は投与が不完全であったため除外した。
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 5.2.1.3　マウスを用いた混餌投与による 13 週間反復投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.10B-0570208] は，AHU を混餌投与した ICR 系マウスにおける毒性評価及びがん原性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の ICR 系マウスに，飼料に混合・調製した AHU を 0，100，250，500，1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で 13 週間自由摂取させた。

本試験では，AHU 投与に関連した死亡はみられなかった。一般状態の変化として，250 mg/kg/日以上の群で下腹部の汚れが認められた。100 mg/kg/日群の雄及び 250 mg/kg/日以上の群の雌雄で，嗜好性に関連したと考えられる飼料の食べこぼしが多くみられたが，体重及び一般状態への影響は認められなかったことから，毒性学的意義は低いものと考えられた。体重及び摂餌量に AHU 投与に関連した変化はみられず，眼科学的検査でも異常は認められなかった。

血液学的検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。血液生化学的検査では，2000 mg/kg/日群の一部の個体で，BUN，クレアチニン，グロブリン，リン及びカリウムの増加，アルカリフォスファターゼ（alkaline phosphatase，ALP）の上昇，コレステロールの低下が認められた。

剖検，器官重量測定及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。100 mg/kg/日群の雌 1 例及び 2000 mg/kg/日群の雌雄各 1 例に良性の細気管支・肺胞腺腫が認められた。追加検査を行った結果，250 mg/kg/日群の雄 1 例で肺胞上皮の過形成が，1000 mg/kg/日群の雄 2 例及び 2000 mg/kg/日群の雄 1 例で良性の細気管支・肺胞腺腫が認められた。対照群の発現頻度と比較した結果，これらの変化の発現頻度に統計学的な有意差は認められなかった。良性細気管支・肺胞腺腫については，供試マウスの系統における背景データの範囲内の発現頻度であること，及び腫瘍の発現に用量依存性が認められなかったことから，AHU 投与との関連性は低いものと判断した。

トキシコキネティクスでは，用量増加に伴う AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，2000 mg/kg/日群で血液生化学的検査値の変動が認められたことから，本試験の無毒性量は 1000 mg/kg/日と考えられた。

**Table 5-5　マウスを用いた混餌投与による 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cavg | AUC0-24h | Cavg |
| 試験 12 日 | 100 | 雄 | 433 | 18.0 | 2700 | 113 |
| | | 雌 | 713 | 29.7 | 1760 | 73.3 |
| | 250 | 雄 | 1160 | 48.3 | 7150 | 298 |
| | | 雌 | 855 | 35.6 | 4030 | 168 |
| | 500 | 雄 | 1240 | 51.7 | 8660 | 361 |
| | | 雌 | 1970 | 82.1 | 9610 | 400 |
| | 1000 | 雄 | 4540 | 189 | 25200 | 1050 |
| | | 雌 | 4260 | 178 | 23400 | 975 |
| | 2000 | 雄 | 9080 | 378 | 77900 | 3250 |
| | | 雌 | 11400 | 475 | 37200 | 1550 |
| 試験 76 日 | 100 | 雄 | 250 | 10.4 | 999 | 41.6 |
| | | 雌 | 255 | 10.6 | 1100 | 45.8 |
| | 250 | 雄 | 4650 | 194 | 8050 | 335 |
| | | 雌 | 794 | 33.1 | 2810 | 117 |
| | 500 | 雄 | 463 | 19.3 | 5780 | 241 |
| | | 雌 | 1280 | 53.3 | 4440 | 185 |
| | 1000 | 雄 | 2330 | 97.1 | 21000 | 875 |
| | | 雌 | 2180 | 90.8 | 8080 | 337 |
| | 2000 | 雄 | 3430 | 143 | 51000 | 2130 |
| | | 雌 | 5220 | 218 | 31300 | 1300 |

Source: Table 2.6.7.10B-0570208
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 5.2.1.4　マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.10C-0770896] は，AHU を経口投与した ICR 系マウスにおける毒性評価及びがん原性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 10 例の ICR 系マウスに，0.5% HPC 液に懸濁した AHU を 0，400，800 及び 1200 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。

本試験では死亡はみられなかった。AHU 投与に関連した一般状態，体重及び摂餌量の変化はみられず，眼科学的検査における異常も認められなかった。

血液学的検査，血液生化学的検査及び尿検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。

剖検，器官重量及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，AHU の用量に依存した AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は 1200 mg/kg/日と考えられた。

**Table 5-6 マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 11 週 | 400 | 雄 | 3380 | 2810 | 106000 | 100000 |
| | | 雌 | 5410 | 4730 | 111000 | 82700 |
| | 800 | 雄 | 8000 | 2480 | 178000 | 44600 |
| | | 雌 | 31300 | 28100 | 337000 | 261000 |
| | 1200 | 雄 | 55000 | 17200 | 759000 | 230000 |
| | | 雌 | 33800 | 17900 | 510000 | 268000 |

Source: Table 2.6.7.10C-0770896
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

## 5.2.2 がん原性試験

### 5.2.2.1 マウスを用いた 104 週間がん原性試験

本試験 [Table 2.6.7.10D-0870374] は，マウスを用いたがん原性試験により AHU のがん原性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 70 例の ICR 系マウスに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を 0，150，400 及び 1200 mg/kg/日の用量で 104 週間経口投与した。

AHU の生存率への影響はみられず，投与期間終了時の生存率は，対照群を含むいずれの群においても，雄では 51～63%，雌では 36～54%の範囲であった。AHU 投与に関連した一般状態の変化，触診可能な腫瘤の発現率，体重及び摂餌量への影響は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した腫瘍性及び非腫瘍性病変は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，AHU 投与群のマウスで AHU 及び LBQ への曝露が認められ，投与 0.5 及び 1 時間後の平均血漿中濃度には用量比を上回る増加が認められた。

以上のとおり，マウスを用いたがん原性試験において，AHU のがん原性を示唆する変化は認められなかった。本試験条件下における最大耐量は，雌雄ともに 1200 mg/kg/日と考えられた。

### 5.2.2.2 ラットを用いた 104 週間がん原性試験

本試験 [Table 2.6.7.10E-0870373] は，ラットを用いたがん原性試験により AHU のがん原性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 50 例の Wistar 系ラットに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を 0，50，150 及び 400 mg/kg/日の用量で 104 週間経口投与した。

AHU の生存率への影響はみられず，投与期間終了時の生存率は，対照群を含むいずれの群においても，雄では 62～76%，雌では 60～68%の範囲であった。試験中，AHU に関連した一般状態の変化，触知可能な腫瘤，体重及び摂餌量への影響は認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した腫瘍性及び非腫瘍性病変は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，AHU 投与群のマウスで AHU 及び LBQ への曝露が認められ，投与 0.5 及び 1 時間後の平均血漿中濃度には用量比を上回る増加が認められた。

以上のとおり，ラットを用いたがん原性試験において，AHU のがん原性を示唆する変化は認められなかった。本試験条件下における最大耐量は，雌雄ともに 400 mg/kg/日と考えられた。

## 5.3 VAL

マウス及びラットを用いた 104 週間がん原性試験（マウス：10，40，160 mg/kg/日，ラット：10，50，200 mg/kg/日）において，VAL のがん原性を示唆する変化は認められなかった（ディオバン錠，20mg，40mg，80mg；製造承認申請資料添付資料ニ-22～25）。

## 5.4 NEP 遺伝子変異と腫瘍進行との関連性に関する *in silico* 解析

NEP は endothelin-1，fibroblast growth factor-2 等，細胞遊走及び心血管形成に関与する複数のペプチドを不活性化することから，NEP 阻害薬の理論上のリスクとして腫瘍転移への関与が懸念される（Goodman et al. 2006）。そこで，腫瘍進行に関する理論上のリスクに関する検討として，NEP コード遺伝子（membrane metallo-endopeptidase，MME）の変異と腫瘍進行との関連性について，ゲノムワイド関連解析（genome wide association study，GWAS）及び SNP 変異データベースを使用した *in silico* 解析により評価した[Table 2.6.7.17E-1470340]。

悪性腫瘍に関連した GWAS において，生殖細胞系の MME 遺伝子変異と表現型（腫瘍）との関連は認められなかった（Stadler et al. 2010，Patel et al. 2013，Chang et al. 2014）。

体細胞系の *in silico* 解析では，MME 遺伝子変異と既知の腫瘍抑制遺伝子である PTEN 及び p53 等の体細胞変異との類似性は認められなかった。すなわち，ほとんどの腫瘍における NEP 遺伝子のコピー数異常はコピー数増加として現れるのに対し，既知の腫瘍抑制遺伝子ではコピー数減少を示した。MME の変異は短縮型変異ではなくほとんどがミスセンス変異であり，MME 遺伝子内に不規則に分布し，特定の部位に集中した変異は認められなかった。さらに，3 番染色体上の MME 近傍の遺伝子には，MME と同様の変異スペクトル及び変異頻度が認められた。

また，CD10 の免疫組織化学的染色によって検出される NEP 発現と腫瘍の予後との一貫した関連性は認められていない。前立腺癌，小細胞性肺癌等の一部の腫瘍では，腫瘍進行に伴い CD10 の発現は低下するのに対し，他の試験では CD10 発現増加と腫瘍進行との関連性が認められている。

以上，生殖細胞系及び体細胞系における NEP の遺伝学的解析結果は，NEP 阻害による理論上のリスクである腫瘍進行を裏付けるものではないと考える。

# 6 生殖発生毒性試験

## 6.1 LCZ

### 6.1.1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.12A-0970613] は，LCZ をラットに経口投与し，受胎能及び着床までの初期胚発生への影響を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 25 例の Wistar 系ラットに 0.5%CMC 液に懸濁した LCZ を 0，10，50 及び 150 mg/kg/日の用量で，雄では交配前 4 週間，交配期間中及び剖検日まで，雌では交配前 2 週間，交配期間中及び妊娠 6 日まで経口投与した。妊娠 13 日に雌を剖検し子宮内検査を行った。雄の剖検時には精子検査を実施した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。10 mg/kg/日群の雄 1 例の頸部腹側に触診可能な拡張性の腫瘤が認められたため安楽死処分した。腫瘤は投与 1 週から観察されていることから，先天性の変化であり，本薬投与との関連性はないものと考えられた。

雌雄ともに本薬投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。体重増加の抑制が 150 mg/kg/日群の雄で投与初期にみられ，150 mg/kg/日群の雌で妊娠 0 日から 6 日に認められた。摂餌量の減少が，150 mg/kg/日群の雄で投与初期にみられ，150 mg/kg/日群の雌で妊娠 0 日から 3 日に認められた。

剖検及び器官重量に本薬投与に関連した影響は認められなかった。雌雄の生殖パラメータに本薬投与に関連した影響はみられなかった。

以上のことから，親動物の一般毒性に対する無毒性量は 50 mg/kg/日，親動物の生殖発生毒性及び初期胚発生に対する無毒性量は 150 mg/kg/日と考えられた。

### 6.1.2 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.13A-0670390] は，LCZ を妊娠ラットに経口投与し，胚・胎児発生への影響を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群 25 例の Wistar 系妊娠ラットに，0.5%CMC 液に懸濁した LCZ を 0，30，100 及び 200 mg/kg/日の用量で，妊娠 6 日から 17 日に経口投与した。妊娠 21 日に帝王切開を行い，剖検，子宮内検査及び胎児検査を実施した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態の変化として，すべての本薬投与群で用量及び投与期間依存的な糞量減少が認められた。体重増加の抑制及び体重の低値，並びに摂餌量の低下が 200 mg/kg/日群で認められた。

剖検では，100 mg/kg/日群で膀胱結石が，200 mg/kg/日群で水腎症がそれぞれ一部の個体で観察された。生殖パラメータの変化として，100 mg/kg/日以上の群で着床後死亡率の増加がみられたが，統計学的有意差は認められなかった。その他の生殖パラメータに異常はみられなかった。

胎児検査では，本薬投与の影響はみられず，催奇形性は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，LCZ の用量増加に伴う AHU，LBQ 及び VAL の曝露量の増加が認められた。

以上のことから，母動物の一般状態に対する無毒性量は 100 mg/kg/日，生殖に対する無毒性量は 200 mg/kg/日，胎児に対する無毒性量は 30 mg/kg/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。

**Table 6-1　　妊娠ラットにおける曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 妊娠 17 日 | 30 | 雌 | NC | NA | 5950 | 1970 | 13400 | 3020 |
| | 100 | 雌 | 509 | 157 | 19200 | 3290 | 60000 | 7770 |
| | 200 | 雌 | 821 | 214 | 29400 | 5200 | 119000 | 12100 |

Source: Table 2.6.7.13A-0670390
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL
NC = Not calculated; NA = Not applicable

### 6.1.3　　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.11A-0670279] は，ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群 3 又は 6 例の妊娠ニュージーランドホワイト（New Zealand White，NZW）ウサギに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，1，3，10，30 及び 100 mg/kg/日の用量で，妊娠 7 日から 20 日に経口投与した。妊娠 29 日に帝王切開を行い，剖検，子宮内検査及び胎児検査を実施した。

100 mg/kg/日群の 2 例が妊娠 18 及び 21 日に死亡し，1 例を一般状態不良のため妊娠 24 日に安楽死処分した。さらに，30 mg/kg/日群の 2 例を流産が確認された後に安楽死処分した。一般状態の変化として，3 mg/kg/日以上の群で糞量減少又は無糞がみられ，100 mg/kg/日群で振戦及び活動性の低下が認められた。体重及び摂餌量の低下が 100 mg/kg/日群で認められた。

母動物の剖検では，30 mg/kg/日以上の群の少数例で胆嚢の変色，腫大又は癒着が認められたが，本薬投与との関連性は明らかではなかった。10 及び 30 mg/kg/日群の一部の個体で，全胚吸収が認められた。着床前及び着床後死亡率の増加，後期吸収胚数の増加に伴う総吸収胚数の増加，生存児数の低下が 10 mg/kg/日以上の群でみられた。胎児の外表検査では，本薬投与に関連した異常は認められなかった。

以上のことから，LCZ は 10 mg/kg/日以上で胚・胎児毒性を示すものと考えられた。母動物に対する無毒性量は 30 mg/kg/日と考えられた。

### 6.1.4　　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.13B-0670280] は，LCZ を妊娠ウサギに経口投与し，胚・胎児発生への影響を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群 20 例の妊娠 NZW ウサギに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0，3，10 及 30 mg/kg/日の用量で，妊娠 7 日から 20 日に経口投与した。妊娠 29 日に帝王切開を行い，剖検，子宮内検査及び胎児検査を実施した。

母動物の死亡が 10 mg/kg/日以上の群で認められた。10 mg/kg/日群では妊娠 21 日に 1 例が死亡し，1 例に流産が確認されたため妊娠 26 日に安楽死処分した。30 mg/kg/日群では妊娠 20 日から 27 日に 4 例が死亡し，1 例に流産がみられ，5 例に早産が認められたため安楽死処分した。一般状態の変化として，すべての LCZ 投与群で軟便及び糞量減少，並びにケージ内に赤色物質付着が用量依存的に観察され，30 mg/kg/日群の 2 例では自発運動の低下が認められた。体重低下がすべての LCZ 投与群で用量依存的にみられたが，10 mg/kg/日群では一過性の低下であった。摂餌量の低下が 30 mg/kg/日群で認められた。

剖検では 30 mg/kg/日群の死亡例で胆嚢の腫大，腸管内にガス／液体の貯留が観察された。妊娠子宮重量の低下が 30 mg/kg/日群で認められた。10 mg/kg/日以上の群で後期吸収胚数の増加がみられ，着床後死亡率の増加及び生存胎児数の低下も認められた。胎児体重の増加が 30 mg/kg/日群でみられたが，同腹児数の低下に関連した変化と考えられた。その他の生殖パラメータに異常はみられなかった。

胎児の外表検査では異常及び変異は認められなかった。内臓検査では，10 mg/kg/日以上の群で水頭症が用量依存的に認められた。LCZ 投与に関連した内臓変異は認められなかった。骨格検査では，本薬投与に関連した異常及び変異は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，母動物では LCZ の用量増加に伴う AHU，LBQ 及び VAL の曝露量の増加がみられ，胎児では用量増加に伴う VAL 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，LCZ 投与に関連した胚・胎児致死作用及び催奇形性がみられ，本試験における無毒性量は，母動物及び胎児ともに 3 mg/kg/日と考えられた。

**Table 6-2　　妊娠ウサギにおける曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 妊娠 20 日 | 3 | 52.9 | 15.0 | 1930 | 491 | 41100 | 2850 |
| | 10 | 303 | 56.2 | 8920 | 1810 | 169000 | 10200 |
| | 30 | 878 | 143 | 102000 | 10500 | 400000 | 20100 |

Source: Table 2.6.7.13B-0670280
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

**Table 6-3　　ウサギ胎児における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | LBQ567 (ng/g) | VAL (ng/g) |
|---|---|---|---|
| 妊娠 21 日 | 3 | 1.35 | 8.54 |
| | 10 | 3.68 | 30.7 |
| | 30 | 25.3 | 130 |

Source: Table 2.6.7.13B-0670280

### 6.1.5　出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

LCZ の出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験は実施していない。LCZ 投与による AHU 及び LBQ 曝露量は用量制限毒性により制限されることから，十分な曝露量を得るた

めに，AHU のラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験を実施した。

## 6.2 AHU

### 6.2.1 ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.12B-1370483] は，AHU をラットに経口投与し，受胎能及び着床までの初期胚発生への影響を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 24 例の Wistar 系ラットに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を 0，75，250 及び 750 mg/kg/日の用量で，雄では交配前 4 週間，交配期間中及び剖検日まで，雌では交配前 2 週間，交配期間中及び妊娠 6 日まで経口投与した。妊娠 13 日に雌を剖検し子宮内検査を行った。雄の剖検時には精子検査を実施した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。本薬投与に関連した一般状態の変化として，250 mg/kg/日以上の群の雌雄で流涎が認められた。体重増加の抑制及び摂餌量の減少傾向が 250 mg/kg/日以上の群の雄で認められ，750 mg/kg/日の雄では体重減少がみられた。

剖検及び器官重量に本薬投与に関連した影響は認められなかった。雌雄の生殖パラメータに本薬投与に関連した影響はみられなかった。

以上のことから，本試験における無毒性量は，雄親動物の一般毒性に対しては 250 mg/kg/日，雌親動物では 750 mg/kg/日，親動物の生殖発生毒性及び初期胚発生に対する無毒性量は 750 mg/kg/日と考えられた。

### 6.2.2 ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.13C-0570301] は，AHU を妊娠ラットに経口投与し，胚・胎児発生への影響を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群 25 例の Wistar 系妊娠ラットに，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を 0，75，250 及び 750 mg/kg/日の用量で，妊娠 6 日から 17 日に経口投与した。妊娠 21 日に帝王切開を行い，剖検，子宮内検査及び胎児検査を実施した。

AHU 投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態の変化として，75 mg/kg/日以上の群で異常呼吸音（ラ音）が，750 mg/kg/日群では流涎が散見された。250 mg/kg/日以上の群で体重の低下がみられ，750 mg/kg 日群で摂餌量の減少が認められた。

剖検で異常はみられず，子宮重量及び胎児の生殖パラメータにも AHU 投与の影響は認められなかった。

胎児検査では，胎児の外表，内臓及び骨格に AHU 投与の影響は認められなかった。

以上のことから，本試験における無毒性量は，母動物に対しては 250 mg/kg/日，胎児に対しては 750 mg/kg/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。

**Table 6-4　　妊娠ラットにおける曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 妊娠 17 日 | 75 | 2460 | 289 | 60300 | 10500 |
| | 250 | 56800 | 6600 | 58700 | 13400 |
| | 750 | 38000 | 24600 | 659000 | 67000 |

Source: Table 2.6.7.13C-0570301
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 6.2.3　　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.11B-0570143] は，ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群 3 例の妊娠 NZW ウサギに 0.5% CMC 液に懸濁した AHU を，0，10，50，100 及び 200 mg/kg/日の用量で，妊娠 7 日から 20 日に経口投与した。妊娠 29 日に帝王切開を行い，剖検，子宮内検査及び胎児検査を実施した。

AHU 投与に関連した死亡はみられず，一般状態，体重，摂餌量に異常は認められなかった。

剖検では異常はみられず，子宮重量（子宮内胎児を含む）及び生殖パラメータへの影響も認められなかった。

胎児の外表検査では，AHU 投与の影響は認められなかった。

以上のことから，本試験条件下では 200 mg/kg/日までの用量で良好な忍容性が認められた。なお，供試投与液では投与容量の許容限度を超えるため，さらなる高用量を投与することはできなかった。

### 6.2.4　　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.11B-0570339] は，ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的として GLP 非適用で実施した。1 群 3 例（1000 mg/kg/日群は 6 例）の妊娠 NZW ウサギに，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を，0，200，500 及び 1000 mg/kg/日の用量で，妊娠 7 日から 20 日に経口投与した。妊娠 29 日に帝王切開を行い，剖検，子宮内検査及び胎児検査を実施した。

AHU 投与に関連した死亡又は瀕死が 1000 mg/kg/日群の 6 例中 5 例に認められたため，残りの生存例 1 例も安楽死処分し，この群は途中終了とした。

一般状態の変化として，200 mg/kg/日以上の群で糞量の減少，500 mg/kg/日以上の群で軟便，被毛の汚れ，1000 mg/kg/日群では下痢が認められた。体重増加の抑制が 200 mg/kg/日以上の群でみられ，体重の低下が 500 mg/kg/日以上の群で認められた。摂餌量の減少が 200 mg/kg/日以上の群で認められた。

剖検では，1000 mg/kg/日群の死亡・瀕死例で胃のびらんが認められた。AHU 投与に関連した生殖パラメータの変化は認められなかった。

胎児重量の低下が 500 mg/kg/日群で認められた。胎児の外表検査では，AHU 投与に関連した影響は認められなかった。

以上のとおり，1000 mg/kg/日群では忍容性は認められなかった。200 mg/kg/日以上の群で，一般状態の変化，並びに体重及び摂餌量の低下を特徴とする母動物毒性がみられ，500 mg/kg/日群では胎児毒性が認められた。

### 6.2.5 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.13D-0770644] は，AHU を妊娠ウサギに経口投与し，胚・胎児発生への影響を検討することを目的として GLP 適用で実施した。1 群 20 例の妊娠 NZW ウサギに，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を，0，15，50，200 及び 500 mg/kg/日の用量で，妊娠 7 日から 20 日に経口投与した。妊娠 29 日に帝王切開を行い，剖検，子宮内検査及び胎児検査を実施した。

500 mg/kg/日群の 3 例で糞量減少及びケージ受け皿に赤色物質が観察され瀕死状態を呈したため安楽死処分した。他の 1 例では流産が認められたため安楽死処分した。また，対照群の 1 例に呼吸異常音（ラ音）が観察されたため安楽死処分した。剖検の結果，心臓及び肺の先天異常が認められた。

一般状態の変化として，500 mg/kg/日群で糞便異常（糞量減少，無糞）の増加が認められた。体重の低値が 200 mg/kg/日以上の群でみられ，摂餌量の低下が 15 mg/kg/日以上の群で認められた。

生存例の剖検では投与に関連した異常はみられなかった。生殖パラメータの変化として，500 mg/kg/日群で後期吸収胚数及び着床後死亡率の増加がみられ，胎児重量の低下も認められた。

胎児の外表検査では，500 mg/kg/日群の 1 例で短巻尾がみられた。内臓検査では，内臓異常として 500 mg/kg/日群の母動物の異なる 3 例の胎児で胆嚢欠損が認められた。AHU 投与に関連した内臓変異は認められなかった。骨格検査では，500 mg/kg/日群の異なる母動物で舌骨形態異常が 2 例，頸椎体半椎体，頸椎体癒合／形態異常が各 1 例に認められた。骨格変異として，舌骨弯曲及び不完全骨化がみられたが，いずれも発現頻度が低く，明確な用量依存性が認められなかったことから，発生毒性を示唆する変化ではないと判断した。また，500 mg/kg/日群でみられた骨化遅延の発現頻度の増加は，胎児の体重低下を伴うものであり，母動物毒性の発現用量における明らかな骨化に関する発生遅延を示唆するものと考えられた。

トキシコキネティクスでは，15～50 mg/kg/日群の間で AHU の曝露量（AUC 及び Cmax）の用量に比例した増加がみられ，50 mg/kg/日を上回る群では用量比を上回る増加が認められた。LBQ の曝露量（AUC 及び Cmax）は，本試験の用量範囲内ではほぼ用量に比例した増加が認められた。

以上のことから，本試験における無毒性量は，母動物に対しては 50 mg/kg/日，胎児に対しては 200 mg/kg/日と考えられた。催奇形性は認められなかった。

**Table 6-5　　妊娠ウサギにおける曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 妊娠 20 日 | 15 | 843 | 114 | 35100 | 4440 |
| | 50 | 2240 | 308 | 129000 | 15500 |
| | 200 | 16400 | 2030 | 679000 | 68200 |
| | 500 | 71300 | 7860 | 1730000 | 171000 |

Source: Table 2.6.7.13D-0770644
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 6.2.6　　ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.14A-1070349] は，AHU をラットの妊娠中期から授乳期に経口投与し，出生児の発生並びに母動物の機能に対する影響を評価することを目的とし GLP 適用で実施した。1 群 24 例の Wistar 系妊娠ラットに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を，0，50，250 及び 750 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日から分娩後 20 又は 22 日まで経口投与した。離乳後，各群の母動物から雌雄各 1 例を無作為に選別し，身体的発達，性成熟及び機能発達についての観察期間後に交配させ，妊娠 13 日に剖検・子宮内検査を行った。

AHU 投与に関連した母動物の死亡はみられず，一般状態，体重，摂餌量及び剖検で異常な変化は認められなかった。母動物の生殖パラメータ（妊娠率，出産率，妊娠日数，出生率，生存児数，死亡児数及び異常児数，性比及び着床痕数）に，AHU 投与に関連した影響はみられなかった。

F1 出生児の出生率，生存率及び離乳率，並びに出生後の一般状態に AHU 投与に関連した影響は認められなかった。F1 出生児の体重のごく軽度の低下が 750 mg/kg/日群で認められた。身体的発達に影響はみられず，剖検で異常は認められなかった。

離乳後の F1 動物では，AHU 投与に関連した死亡はみられず，一般状態，体重及び摂餌量への影響は認められなかった。剖検で異常は認められなかった。視覚機能，性成熟及び機能発達に異常はみられず，F1 親動物の生殖能及び子宮内検査における生殖パラメータに，AHU 投与に関連した影響は認められなかった。

以上のことから，本試験における無毒性量は，母動物（F0）に対しては 750 mg/kg/日，F1 出生児の発生に対しては 250 mg/kg/日と考えられた。

## 6.3　　VAL の生殖発生毒性試験

生殖能試験では，F0 動物の生殖能及び F1 動物の発生に及ぼす影響は認められなかった。マウス，ラット及びウサギを用いた胎児の器官形成期投与試験では催奇形性を示唆する変化は認められなかった。ウサギでは，5 mg/kg/日以上の群で死亡を含む母動物毒性及び胎児毒性（吸収胚数増加，胎児体重低下，骨格変異を伴う小胎児，側脳室拡張増加）が認められた。ラットを用いた周産期及び授乳期投与試験では，600 mg/kg/日群で母動物の体重増加の抑制がみられ，出生児の

発生及び生存率にわずかな低下が認められた。胎児の腎臓の発生には影響は認められなかった（ディオバン錠，20mg，40mg，80mg；製造承認申請資料添付資料ニ-11～16）。

## 6.4 幼若動物を用いた試験

### 6.4.1 LCZ

LCZ の幼若動物を用いた毒性試験は，VAL の腎毒性により用量が制限され，AHU 及び LBQ の毒性評価が十分に行われない可能性が考えられるため実施しなかった。

### 6.4.2 AHU

#### 6.4.2.1 幼若ラットを用いた用量設定試験

本試験 [Table 2.6.7.15A-0870735] は，AHU を幼若ラットの生後 7～34 日に経口投与し，幼若動物を用いた毒性試験の用量設定根拠となる情報を得ることを目的とし GLP 非適用で実施した。1 群雌雄各 12 例の 7 日齢の Wistar 系ラットに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を，0，100，400 及び 800 mg/kg/日の用量で 28 日間反復経口投与した。

対照群の雄 1 例，400 mg/kg/日群の 4 例及び 800 mg/kg/日群の 8 例に，死亡又は瀕死状態が認められた。剖検で投与過誤を示唆する所見が認められた。

離乳後の一般状態に AHU 投与に関連した変化は認められなかった。体重増加の抑制が 400 mg/kg/日以上の群でみられ，体重の低下が 400 mg/kg/日群の雄及び 800 mg/kg/日群の雌雄で認められた。

生後 35 日の剖検では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。

以上のとおり，400 mg/kg/日以上の群で体重増加の抑制がみられたことから，本試験における無毒性量は 100 mg/kg/日と考えられた。

#### 6.4.2.2 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.15B-0870734] は，AHU を幼若ラットに経口投与し，幼若動物で発現する毒性を評価することを目的とし GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 52 例の 7 日齢の Wistar 系ラットに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を，0，100，400 及び 800 mg/kg/日の用量で 9 週間反復経口投与した。出生児に対する影響については，生死確認，一般状態観察，体重，摂餌量，身体発達（開眼，膣開口，包皮分離），感覚発達（聴覚性驚愕馴化，視覚機能），行動成績（自発運動量，水迷路），生殖能検査（交配，妊娠 13 日の子宮検査），血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，トキシコキネティクス，骨密度測定（*in vivo* 及び *ex vivo* pQCT），X 線検査（*in vivo* 及び *ex vivo*），器官重量，剖検，組織学的形態計測及び病理組織学的検査により評価した。

AHU 投与に関連した死亡はみられず，出生児の発生，発達及び生殖能への影響は認められなかった。一般状態の変化として，800 mg/kg/日群で腹部内臓硬化，被毛湿潤及び流涎が認められ

た。体重増加の抑制がすべての AHU 投与群で離乳直後まで認められた。摂餌量の増加が 800 mg/kg/日群で離乳後に認められた。

血液学的検査及び尿検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。血液生化学的検査では，すべての AHU 投与群の雌雄でリンの増加が，800 mg/kg/日群の雌雄で BUN の増加が認められた。休薬終了時の検査では，800 mg/kg/日群の雄でグルコース及びトリグリセリドの増加が，雌で ALT 及び AST の上昇が散見された。

剖検，器官重量及び組織学的形態計測に AHU 投与に関連した変化は認められなかった。病理組織学的検査では，100 mg/kg/日以上の群で胃の扁平上皮の粘膜過形成及び空胞化が認められた。

骨密度測定では，400 mg/kg/日以上の群の雌雄で骨幹端の骨量（骨密度及び骨塩量）の低下，400 mg/kg/日以上の群の雄及び 800 mg/kg/日群の雌で骨幹の骨量の低下がみられ，X 線検査では，800 mg/kg/日群で軽度の骨長（大腿骨及び脛骨）の低下が認められた。休薬期間終了時における骨長，骨径及び骨量に，媒体対照群と差は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，試験 64 日の AHU の曝露量は用量比を上回る増加を示し，LBQ の曝露量は高用量で用量比を上回る増加を示した。

以上のことから，本試験の無毒性量は 100 mg/kg/日と考えられた。

**Table 6-6　　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 7 日 | 100 | 雄 | NT | NT | 435000 | 51000 |
| | | 雌 | NT | NT | 309000 | 43900 |
| | 400 | 雄 | NT | NT | 1780000 | 145000 |
| | | 雌 | NT | NT | 1990000 | 202000 |
| | 800 | 雄 | NT | NT | 3240000 | 248000 |
| | | 雌 | NT | NT | 3200000 | 213000 |
| 試験 64 日 | 100 | 雄 | 874 | 252 | 46600 | 10400 |
| | | 雌 | 402 | 226 | 37300 | 12200 |
| | 400 | 雄 | 4590 | 610 | 157000 | 19300 |
| | | 雌 | 5360 | 1010 | 207000 | 27000 |
| | 800 | 雄 | 16300 | 5440 | 465000 | 75000 |
| | | 雌 | 12100 | 1340 | 802000 | 77500 |

Source: Table 2.6.7.15B-0870734
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL
NT = Not tested；採血時の前処置過誤により，AHU は測定できなかった

### 6.4.2.3　幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験

本試験 [Table 2.6.7.15C-1170516] は，AHU による骨への影響の発現機序検討を目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 12 例の 7 日齢の Wistar 系ラットに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を，0，100，400 及び 800 mg/kg/日の用量で 4 週間（7～35 日齢）反復経口投与した。さらに，1 群雌雄各 6 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 16 週間の休薬により回復性について検

討した。また，遺伝子発現解析，骨代謝バイオマーカー及びホルモン測定用試料は，サテライト群（1 群雌雄各 52～55 例）の動物から採取した。本試験では，一般状態観察，体重，摂餌量，血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，骨代謝バイオマーカー測定［C テロペプチド（C-telopeptide，CTx），酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ 5b（tartrate resistant acid phosphatase 5b，TRACP-5b），オステオカルシン，1 型プロコラーゲン-N-プロペプチド（procollagen type 1 amino-terminal propeptide，P1NP）］，ホルモン測定［副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone，PTH），1,25-ジヒドロキシビタミン D），*in vivo* 骨密度測定［2 重エネルギーエックス線吸収測定法（dual-energy x-ray absorptiometry，DXA），末梢骨定量コンピュータ断層法（peripheral quantitative computed tomography，pQCT）］，X 線検査，剖検，病理組織学的検査，組織学的形態計測（脛骨骨幹端，脛骨骨幹，海綿骨，皮質骨），*ex vivo* 骨密度測定（DXA，pQCT），骨強度検査及びトキシコキネティクスを実施した。

AHU 投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態の変化として，800 mg/kg/日群の雌雄で腹部膨満及び腹部内臓硬化が認められた。体重増加の抑制が 400 mg/kg/日以上の群の雌雄で認められた。離乳後の摂餌量に対照群との差は認められなかった。

骨の X 線検査では，400 mg/kg 群の雌で大腿骨骨長の減少，800 mg/kg 群で大腿骨及び脛骨の骨長減少，腰椎長減少傾向が認められた。骨密度測定では，800 mg/kg 群で DXA において全身，腰椎及び大腿骨の骨面積，骨塩量及び骨密度の低下，脛骨骨幹端の pQCT において総骨面積，骨量パラメータ（骨全体，骨梁及び皮質骨／皮質下の骨密度及び骨塩量）の低下が認められた。成長板への影響は認められなかった。*Ex vivo* 骨強度検査（大腿骨，腰椎）では，400 mg/kg 群の雄で大腿骨及び腰椎の骨強度の低下傾向，骨密度及び骨形態の軽微な変化，800 mg/kg 群の雌雄で骨強度，骨密度，骨形態計測パラメータの低下が認められた。骨強度の変化は，構造パラメータで顕著にみられ骨サイズで補正した場合は影響が小さくなることから，骨マトリクス組成に対する影響ではなく骨サイズに関連した変化であり，毒性学的意義はないものと考えられた。骨長，骨サイズ及び骨量の変化は，休薬による回復性が認められた。カルシウム調節ホルモン（PTH 及び 1,25-ジヒドロキシビタミン D），骨代謝バイオマーカー（TRACP-5b，P1NP），及び C 型ナトリウム利尿ペプチド（C-Type natriuretic peptide，CNP）に投薬の影響はみられなかった。すべての投薬群で CTx の低下がみられたが，TRACP-5b 及びホルモンの変化がみられていないことから，骨吸収の低下ではなく CTx の分解又は排泄への影響によるものと考えられた。このことは，骨形態計測において破骨細胞パラメータへの影響が認められなかったことにより支持される。400 mg/kg 以上の群でオステオカルシンの増加傾向がみられたが，P1NP，骨密度，組織学的形態計測及びホルモン測定で骨形成亢進を示唆する変化が認められなかったことから，投薬の影響ではないと考えた。組織学的形態計測では，800 mg/kg 群の雄で脛骨皮質骨の全組織面，骨髄腔面，骨膜周囲長及び内骨面周囲長の低下がみられ，内骨面吸収の軽度増加を伴う内骨面骨形成率の低下傾向が認められた。脛骨海綿骨パラメータの変化は認められなかった。また，成長板，骨髄，骨質，骨石灰化に AHU 投与の影響は認められなかった。

生後 7 日齢の AHU377 及び LBQ657 の曝露量は生後 21 又は 34 日齢の曝露量に比較して，AHU377 で 6~36 倍，LBQ657 で 1~4 倍の高値を示した。AHU377 から LBQ657 にはエステラーゼにより代謝されることから，生後 7 日齢の高曝露はエステラーゼ活性の週齢差に関連した可能性が考えられる。

**Table 6-7　　幼若ラットを用いた探索的試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 生後 7 日 | 100 | 雄 | 21400 | 16900 | 203000 | 20700 |
| | | 雌 | 20200 | 17700 | 176000 | 25400 |
| | 400 | 雄 | 83700 | 22900 | 752000 | 60600 |
| | | 雌 | 49200 | 12100 | 700000 | 85300 |
| | 800 | 雄 | 121000 | 49400 | 1350000 | 151000 |
| | | 雌 | 137000 | 36000 | 1400000 | 95000 |
| 生後 21 日 | 100 | 雄 | 1900 | 393 | 182000 | 19700 |
| | | 雌 | 1340 | 292 | 117000 | 18800 |
| | 400 | 雄 | 9010 | 1650 | 574000 | 61800 |
| | | 雌 | 5530 | 918 | 485000 | 70300 |
| | 800 | 雄 | 14500 | 1720 | 813000 | 75900 |
| | | 雌 | 18800 | 2710 | 895000 | 140000 |
| 生後 34 日 | 100 | 雄 | 751 | 446 | 47200 | 20100 |
| | | 雌 | 564 | 275 | 45500 | 21400 |
| | 400 | 雄 | 4350 | 1110 | 239000 | 64300 |
| | | 雌 | 7000 | 1470 | 369000 | 62100 |
| | 800 | 雄 | 7620 | 1720 | 645000 | 186000 |
| | | 雌 | 21400 | 2330 | 1090000 | 81200 |

Source: Table 2.6.7.15C-1170516
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

以上のとおり，骨への影響は一過性であり，骨端軟骨板閉鎖までには成長遅滞を補うための十分な期間があることが示唆された。骨形態計測の結果，骨石灰化及び成長板への影響は認められなかった。骨成長に対する顕著な影響がみられた生後 21 日には，AHU377 及び LBQ657 の曝露も高値であり，体重増加の抑制も認められた。本試験における骨の変化は，ナトリウム利尿ペプチド受容体 C（natriuretic peptide receptor C，NPR-C）経路の阻害により予測されるものとは逆の変化であり，NEP 阻害による CNP の変化も認められなかった。本試験で認められた骨長及び骨量の変化の機序の詳細は明らかではないが，NEP 又は NPR-C 経路の阻害に関連したものではなく，体重増加（身体的発達）に対する影響に関連した変化である可能性が考えられた。

### 6.4.2.4　幼若ウサギを用いた反復投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.15D-1170514] は，AHU を幼若ウサギに経口投与し，幼若動物で発現する毒性を評価することを目的とし GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 16 例の 28 日齢の NZW ウサギに

50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を，0，5，50 及び 150 mg/kg/日の用量で 4 週間反復経口投与した。さらに，1 群雌雄各 6 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 7 週間の休薬により回復性について検討した。

AHU 投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態，体重及び摂餌量に AHU 投与に関連した変化はみられず，血液学的検査，血液生化学的検査，骨形態検査及び病理組織学的検査では異常は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，AHU 及び LBQ の用量比例的な曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，本試験条件下において幼若ウサギの成長，骨長，骨代謝に関するバイオマーカー，骨塩量，骨密度, 骨形状及び骨強度への影響は認められなかった。幼若ウサギの骨に対する無毒性量は 150 mg/kg/日と考えられた。

**Table 6-8　　幼若ウサギを用いた反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 生後 28 日 | 5 | 雄 | 131 | 23.9 | 3310 | 605 |
| | | 雌 | 152 | 36.0 | 3590 | 707 |
| | 50 | 雄 | 1480 | 227 | 35300 | 6240 |
| | | 雌 | 892 | 305 | 19700 | 7980 |
| | 150 | 雄 | 3870 | 687 | 74200 | 11400 |
| | | 雌 | 4750 | 908 | 97300 | 15700 |
| 生後 55 日 | 5 | 雄 | 112 | 27.7 | 3920 | 744 |
| | | 雌 | 139 | 51.2 | 4330 | 1340 |
| | 50 | 雄 | 1180 | 269 | 37300 | 8670 |
| | | 雌 | 1470 | 289 | 41200 | 7150 |
| | 150 | 雄 | 4410 | 1270 | 112000 | 21800 |
| | | 雌 | 6900 | 1440 | 136000 | 19200 |

Source: Table 2.6.7.15D-1170514
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

## 6.4.3　VAL

### 6.4.3.1　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.15E-0680270] は，VAL を幼若ラットに経口投与し，幼若動物で発現する毒性を評価することを目的とし GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 52 例の 7 日齢の Wistar 系ラットに 0.5% Tween80 添加 0.5% CMC 液に懸濁した VAL を，0，1，20 及び 150 mg/kg/日の用量で 9 週間反復経口投与した。出生児に対する影響については，生死確認，一般状態観察，体重，摂餌量，身体発達（膣開口，包皮分離），感覚発達（聴覚性驚愕馴化，視覚機能），行動成績（自発運動量，水迷路，受動的回避学習），生殖能検査（交配，妊娠 13 日の子宮検査，精子検査），血液学的検査，血液生化学的検査，尿検査，トキシコキネティクス検査，器官重量，剖検及び病理組織学的検査により評価した。

VAL 投与に関連した離乳後動物の死亡が，1，20，150 mg/kg/日群でそれぞれ 1，4 及び 8 例に認められた。20 mg/kg/日群の 2 例，150 mg/kg/日群の 6 例の死亡・瀕死は離乳後 3 日以内に発現し，脱水が認められた。150 mg/kg/日群の雄 1 例が試験 24 日に死亡し，他の死亡・瀕死例でみられていない所見として脾臓のリンパ萎縮・壊死，胸腺のリンパ壊死が認められた。20 mg/kg/日群の雌 1 例が試験 69 日に死亡し，尿細管腎症が死因と考えられた。

離乳前の動物に VAL 投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。離乳後の一般状態の変化として，流涎が認められた。眼球の白濁，膨大及び突出が一部の個体でみられたが，VAL 投与との関連性は明らかではなかった。体重の低値が，離乳までは雌雄で，離乳後は雄でみられ，摂餌量の低下が生後 35 日までの雌雄で認められた。

出生児の発生，発達及び生殖能に対する VAL 投与の影響は認められなかった。

血液学的検査では，異常は認められなかった。血液生化学的検査では，すべての投与群で BUN 及びクレアチニンの増加が認められた。尿検査では，すべての投与群で尿比重及び pH の低下が認められた。

剖検では，腎臓の表面粗糙，腎盂拡張及び腎盂液体貯留が認められた。器官重量の変化として，150 mg/kg/日群の雄で前立腺重量の増加がみられた，病理組織学的検査では，VAL 投与に関連した変化として，腎臓で尿細管腎症及び傍糸球体細胞の肥大・過形成が，すべての投与群の一部の雄及び 150 mg/kg/日群の雌で胃の非腺胃部の粘膜上皮に空胞化が認められた。

トキシコキネティクスでは，用量増加に伴う VAL の曝露量の増加が認められた。

以上のことから，本試験では無毒性量を設定することはできなかった。

**Table 6-9　　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | VAL | |
|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h (µg•h/mL) | Cmax (µg/mL) |
| 生後 7 日 | 1 | 雄 | 16.0 | 0.916 |
| | | 雌 | 14.3 | 0.653 |
| | 20 | 雄 | 268 | 14.0 |
| | | 雌 | 320 | 15.9 |
| | 150 | 雄 | 608 | 117 |
| | | 雌 | 957 | 92.9 |
| 生後 70 日 | 1 | 雄 | 0.505 | 0.250 |
| | | 雌 | 0.430 | 0.230 |
| | 20 | 雄 | 15.0 | 5.04 |
| | | 雌 | 14.9 | 6.51 |
| | 150 | 雄 | 82.5 | 21.7 |
| | | 雌 | 101 | 28.5 |

Source: Table 2.6.7.15E-0680270

# 7 局所刺激性試験

## 7.1 LCZ

### 7.1.1 雄ラットを用いた 3 日間反復皮下投与による忍容性試験

本試験 [Table 2.6.7.16A-0670623] は，LCZ の 3 日間反復皮下投与によりラットで発現する毒性を検討することを目的として GLP 非適用で実施した。1 群 5 例の Wistar 系雄ラットに，生理食塩液に懸濁した LCZ を 200 mg/kg/日の用量で 3 日間皮下投与した。

本試験で死亡は認められなかった。LCZ 投与に関連した投与部位の変化として，腫脹，発赤，痂皮及び痣が認められた。剖検では，浮腫，赤色化，痂皮形成がみられ，病理組織学的検査では，痂皮形成及び浮腫を伴う出血及び潰瘍，並びに炎症を伴う皮下結合組織及び筋肉の壊死，及び筋肉再生が認められた。

トキシコキネティクスでは，AHU 及び LBQ の皮下投与による曝露量は経口投与後の曝露量と同等であったが，皮下投与後の VAL の曝露量は経口投与による曝露量の約 4 倍を示した。

以上のとおり，LCZ を 200 mg/kg/日の用量でラットに皮下投与した結果，忍容性は認められなかった。

**Table 7-1 雄ラットを用いた皮下投与による忍容試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 200 | 雄 | 4470 | 2270 | 59300 | 11200 | 297000 | 75500 |

Source: Table 2.6.7.16A-0670623
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 7.1.2 雄ラットを用いた経口投与及び皮下投与による 5 日間反復投与探索的毒性試験

本試験 [Table 2.6.7.16A-0670624] は，経口投与及び皮下投与により LCZ を 2 週間反復投与し，ラットで発現する毒性を比較検討することを目的として GLP 非適用で実施した。1 群 10 例の Wistar 系雄ラットに，0.5% CMC 液に懸濁した LCZ を 0 及び 200 mg/kg/日の用量で経口投与，又は生理食塩液に懸濁した LCZ を 0 及び 200 mg/kg/日の用量で皮下投与した。注射部位の毒性変化のため，試験 5 日で試験を終了した。

本薬投与に関連した死亡は認められなかった。経口投与群では，体重増加量の減少がみられたが，一般状態の変化は認められなかった。皮下投与群では，一般状態の変化として，投与部位の変化（腫脹，発赤，痂皮及び肥厚）がみられ，一部の個体では投与部位の変色が認められた。これらの投与部位の変化は，試験終了時（試験 5 日）まで観察された。投与部位の変化は重篤であり，投与継続は困難と判断し，試験 5 日で試験終了した。

病理組織学的検査では，経口投与群で腺胃の混合細胞型炎症の発現頻度の増加がみられ，皮下投与群では投与局所の重度の炎症が認められた。皮下投与群では，腺胃の炎症は認められなかった。

トキシコキネティクスとして投与 2 時間後の血漿中薬物濃度を測定した結果，皮下投与群の AHU，LBQ 及び VAL 濃度は，経口投与群に比較していずれも高値を示した。

以上のとおり，皮下投与群では忍容性は認められなかった。経口投与群でみられた腺胃の炎症が皮下投与群では認められなかったことから，LCZ 投与による腺胃の変化は本薬の局所毒性に起因した変化である可能性が考えられた。

## 7.2 AHU

### 7.2.1 マウスを用いた局所リンパ節試験

本試験 [Table 2.6.7.16B-0770750] は，マウスを用いた局所リンパ節測定法（LLNA）により AHU の皮膚感作性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群雌 6 例の BALB/c 系マウスの両耳介背面皮膚に，N,N-ジメチルホルムアミド（N,N-dimethylformamide，DMF）に溶解した 0（媒体），0.5，5 及び 50%濃度の AHU を，50 µL/動物の容量で 3 日間反復塗布した。陽性対照群には，0.5%濃度のジニトロクロロベンゼン（1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene，DNCB）溶液を同様に塗布した。最終投与の 24 時間後，各個体の耳介リンパ節を採取した。耳介の肉眼的観察，並びに耳介リンパ節の大きさ，重量及び細胞数を測定し，感作性及び刺激性について評価した。

本試験で死亡はみられず，AHU 投与に関連した一般状態の変化は認められなかった。50%濃度 AHU 群では耳介重量，耳介リンパ節重量及び細胞数の増加が認められた。

以上のことから，本試験条件下において AHU は軽度の刺激性を有する軽度感作性物質と考えられた。

### 7.2.2 ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

本試験 [Table 2.6.7.16B-0770751] は，ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験により AHU の皮膚刺激性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群 3 例の NZW ウサギの背部皮膚に，ミリポア水に浸した AHU の 0.5 g/動物を，4 時間半閉塞貼布した。貼布除去の 1，24，48 及び 72 時間後に皮膚反応を観察した。

3 例のウサギのいずれの投与皮膚部位においても，刺激性変化は認められなかった。

以上のことから，本試験条件下では AHU は皮膚刺激性物質には分類されなかった。

### 7.2.3 ウサギを用いた眼一次刺激性試験

本試験 [Table 2.6.7.16B-0770752] は，ウサギを用いた眼一次刺激性試験により AHU の眼刺激性を評価することを目的として GLP 適用で実施した。1 群 3 例の NZW ウサギの片眼の下眼瞼内に，AHU の約 0.1 mL（平均 30.5 mg，適用範囲 30.1～30.9 mg）を適用した。残りの片眼には処置を

行わず無処置対照とした。適用 1，24，48 及び 72 時間後，並びに 7 及び 14 日後に観察し，判定基準に従って評価した。

AHU の適用により，角膜，虹彩及び結膜の変化が認められた。角膜の変化として，混濁（最高スコア：1）及び上皮損傷（最大で角膜面積の 75%）がみられた。虹彩ではスコア：1 の刺激性変化がみられたが，3 例中 2 例では 48 時間以内に，1 例では 72 時間以内に回復が認められた。結膜の刺激性変化として，発赤，結膜浮腫及び分泌物がみられたが，3 例中 1 例では 7 日以内に，2 例では 14 日以内に回復が認められた。

以上のことから，国連 GHS 文書の分類に従うと AHU は眼刺激物（カテゴリー2A）であり，EU 指令（67/548/EEC）に基づく分類では AHU は眼に対する刺激性（R 36）の表示が必要とされる。

# 8 その他の毒性試験

## 8.1 免疫毒性

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

## 8.2 光安全性

AHU，LBQ 及び VAL に，290～700 nm の範囲の波長に特異的な光吸収波長は認められなかった。また，LCZ の分布試験では，メラニンを多く含む組織（ブドウ膜，皮膚）における蓄積は認められなかった。したがって，日光により光化学的に活性化する可能性は低いと考えられることから，光毒性試験は実施しなかった。なお，これまでの臨床使用において，LCZ の光毒性を示唆する変化は認められていない。

## 8.3 依存性

非臨床試験において，明らかな脳内移行性及び薬物乱用に関連する標的分子への作用，並びに依存性を示唆する変化が認められなかったことから，依存性試験は実施しなかった。

## 8.4 NEP 基質への影響に関する探索的試験

### 8.4.1 LCZ の Aβ 代謝に関する探索的試験

LCZ の NEP 阻害作用に関連した理論上のリスクとして，アミロイド前駆体蛋白（amyloid precursor protein，APP）から β セクレターゼ及び γ セクレターゼの連続作用により生成される Aβ の脳内への蓄積が懸念される。アルツハイマー病（Alzheimer’s disease，AD）の病因仮説であるアミロイド仮説では，中枢神経系における Aβ の産生及び消失の不均衡により，可溶性のモノマー及びオリゴマーとして Aβ が脳内に蓄積し，不溶性アミロイド斑を形成し，最終的に AD 及

び認知機能低下に至るとされている（Karran et al. 2011）。アミロイド仮説を支持する遺伝学的背景として，APP 又は Aβ42 の産生増加に関与する遺伝子の変異を有するヒトで AD の早期発症が認められていることが挙げられている。Aβ は，蛋白分解，細胞介在性排泄，能動又は受動輸送等，並行して働く複数の経路により脳から排泄される。NEP は脳内 Aβ の分解に関与するメタロプロテアーゼの 1 種である。げっ歯類の Aβ 分解への NEP の関与は認められているが，NEP を含む蛋白分解酵素の Aβ 代謝における役割は完全には明らかにされていない（Saido and Leissring 2012）。ヒト APP を過剰発現させたトランスジェニックマウスの NEP を欠損（遺伝子ノックアウト）させた実験から，NEP が中枢神経系の Aβ 濃度及びアミロイド斑形成に関与していることが示唆されている（Saido and Leissring 2012）が，この動物モデルが APP の過剰発現であることから，生理学的意義は低く，予定患者集団における NEP 阻害による変化の予測に適切ではない可能性が考えられる。他の動物モデルでは，NEP 阻害剤（Thiorphan）を側脳室内投与したウサギにおいて大脳皮質及び CSF 中 Aβ 濃度の増加がみられ（Marr and Spencer 2010），Thiorphan 又は Aβ42 を頭蓋内投与したサルでは脳で AD 様の病理組織学的変化が認められた（Li et al. 2010）。しかしながら，これらの非臨床試験の結果から，ヒト AD の原因の予測が可能か否かは不明である。一方，ヒトでは，遺伝子変異により NEP を欠損した家系において認知機能障害の早期発症は認められていないこと（Debiec et al. 2004），及び総数 74064 名の遅発性 AD 患者における GWAS では NEP を含む Aβ 分解酵素関連遺伝子が AD のリスク遺伝子として確認されなかったこと（Lambert et al. 2013）が報告されている。

カニクイザルとヒトでは APP の完全な相同性がみられること，ヒト，サル及びイヌでは AD 及び正常加齢の過程で Aβ の脳への蓄積が認められること（Podlisny et al. 1991），加齢及び AD で認められる Aβ 沈着に先行する APP の早期転写及び転写後プロセシングについての検討にはカニクイザルが適切とされている（Cook et al. 2010，Woodruff-Pak 2008）ことから，Aβ クリアランスの変化と脳への蓄積によるリスクを評価する動物種としてカニクイザルを選択した。CSF 採取量及びサンプルサイズを考量して，新規産生 Aβ のクリアランスを適切に推定する SILK-Aβ assay（the amyloid beta stable isotope labeling kinetic assay）により，LCZ の Aβ 代謝に対する影響を検討した（Cook et al. 2010）。試験では CSF，脳及び血漿中の Aβ37，Aβ38，Aβ40 及び Aβ42 を測定した。なお，Aβ37 及び Aβ38 とアミロイド斑形成との関連性は明らかになっていない（Moro et al. 2012）。

試験の概要を以下に示す。

本試験 [Table 2.6.7.17A-1270586，Table 2.6.7.17A-1270586A] は，LCZ の 16 日間反復経口投与によりカニクイザルの CSF 中の Aβ 代謝に対する LCZ の影響を検討することを目的として GLP 非適用で実施した。雌カニクイザル（約 2.5～4 歳，2.2～3.0 kg）に，0.5%CMC 液に懸濁した LCZ を 0 及び 50 mg/kg/日の用量で 16 日間経口投与した。投与開始前の外科的処置として，L-ロイシンの点滴静注用カテーテルを大腿静脈に，CSF 採取用カテーテルを大槽（小脳延髄槽）に挿入した。CSF 中の新規産生 Aβ の消失に対する影響を SILK-Aβ assay により評価した。SILK-Aβ assay

は試験 1 日及び 15 日に行った。媒体若しくは LCZ 投与開始の 12 時間前（試験 -1 日及び 14 日）から $^{13}C_6$標識ロイシンを 12 時間点滴静注し，標識ロイシン投与開始 36 時間後まで経時的に血漿及び CSF を採取し，標識ロイシンを取込んだ新規産生 Aβ の CSF 中濃度を測定した。予備試験の結果から測定に十分な量の CSF を確保するため，試料採取時点ごとの CSF をプールして Aβ（3 例／試料）及び薬物（最大 3 例／試料）濃度測定用試料とした。なお，試験中に一部の個体の CSF 採取ポートの状態不良のため，SILK-Aβ assay の使用動物数は対照群 15 例（5 試料），LCZ 群 12 例（4 試料）であった。最終投与 2 時間後（試験 16 日）に各群 9 例を安楽死処分し，血漿，CSF 及び脳（大脳皮質，海馬）を採取し，各試料中 Aβ 濃度を測定した。試験 1 日及び 15 日の CSF 中 Aβ 濃度は免疫沈降－質量分析系（IP/MS）により測定し，試験 1 日及び 15 日の血漿中 Aβ 濃度及び試験 16 日の CSF 中，血漿中及び脳中 Aβ 濃度はイムノアッセイにより測定した。

試験の結果，一般状態，体重，摂餌量及び体温に LCZ 投与に関連した変化はみられず，剖検で異常は認められなかった。

50 mg/kg/日群の CSF 中 Aβ 濃度（AUC0-24h）の変化として，新規産生 Aβ（標識体）濃度では，試験 1 日に Aβ42 濃度の高値（+20.4%，p=0.039），試験 15 日に Aβ42 濃度（+34.7%，p=0.003），Aβ40 濃度（+23.4%，p=0.009），総 Aβ 濃度（+50.45%，p=0.00002）及び Aβ38 濃度（+64.1%，p=0.0001）の高値が認められた。総 Aβ（標識体+非標識体）濃度については，試験 1 日に変化はみられなかったが，試験 15 日に総 Aβ42 濃度（+33.5%，p=0.034），総 Aβ40 濃度（+26.3%，p=0.062）の高値が認められた。さらに，試験 1 日及び 15 日に総 Aβ37 濃度及び総 Aβ38 濃度の高値，試験 15 日に総 Aβ 濃度の高値が認められた。Aβ の消失に関しては，試験 1 日の新規産生 Aβ42（+65.3%，p=0.026）及び Aβ40（+35.2%，p=0.04），並びに総 Aβ（+29.8%，p=0.04）の消失半減期の延長がみられたが，試験 15 日には新規産生 Aβ 及び総 Aβ の消失半減期に対照群との差は認められなかった。

試験 16 日の剖検時（投与 2 時間後）に採取した脳（大脳皮質，海馬）試料中の Aβ42 及び Aβ40 濃度の高値は認められなかった。イムノアッセイによる測定では，CSF 中 Aβ42 及び Aβ40 濃度は高値であったが統計学的有意差は認められなかった。サルの CSF 中 Aβ 濃度は個体間差が大きいため，比較的少数例の一測定時点のみの比較では，変化を検出できなかった可能性が考えられた。

LCZ 投与 2 及び 12 時間後に，血漿中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の高値がみられ，試験 15 日の投与 12 時間後に最高値を示した（Aβ42：+42%，Aβ40：+54%）。試験 16 日にも同様の傾向が認められた（Aβ42：+52%，Aβ40：+42.3%）。

トキシコキネティクスの結果，LCZ 投与群のすべての動物において，血漿中及び CSF 中に AHU，LBQ 及び VAL が確認された。試験 16 日の投与 2 時間後の CSF 中及び脳中薬物濃度は概して低く，血漿中薬物濃度の 2%未満であった。投与後 0.5～24 時間に，ヒト NEP の *in vitro* 阻害活性（$IC_{50}$：2.3 nM）を上回る CSF 中 LBQ 濃度が認められた。

**Table 8-1　サルを用いた探索的試験における曝露量の要約（試験 1 日及び 15 日）**

| 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| **血漿** | | | | | | | |
| 試験 1 日 | 雌 | 15900 | 7040 | 73100 | 27100 | 7490 | 1890 |
| 試験 15 日 | 雌 | 21500 | 10000 | 83200 | 34400 | 6920 | 2000 |
| **CSF** | | | | | | | |
| 試験 1 日 | 雌 | 38.7 | 10.8 | 129 | 24.2 | 5.04 | 1.47 |
| 試験 15 日 | 雌 | 36.5 | 11.0 | 128 | 19.8 | 7.42 | 0.862 |

単位：AUC0-24h = ng·h/mL，Cmax = ng/mL; CSF = 脳脊髄液
血漿採取動物数：試験 1 日：n=18，試験 15 日：n=17；CSF 採取動物数：プール試料として n=6 (2～3 例/プール試料)，ただし，試験 15 日の動物番号: 2505 は 1 例/プール試料

**Table 8-2　サルを用いた探索的試験における曝露量の要約（試験 16 日）**

| 試料 | AHU | | LBQ | | VAL | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 試料中濃度 | 濃度比 | 試料中濃度 | 濃度比 | 試料中濃度 | 濃度比 |
| 血漿 (ng/mL) | 1730 | 1.00 | 14900 | 1.00 | 1130 | 1.00 |
| CSF (ng/mL) | 7.61 | 0.00440 | 20.7 | 0.00139 | 0.574 | 0.000508 |
| 脳・大脳皮質 (ng/g) | 37.1 | 0.0214 | 147 | 0.00986 | 20.7 | 0.0183 |
| 脳・海馬 (ng/g) | 34.9 | 0.0202 | 114 | 0.00763 | 36.9 | 0.0326 |

濃度比 = 試料中薬物濃度／血漿中薬物濃度

以上のとおり，臨床曝露量相当の LCZ を雌カニクイザルに 2 週間反復経口投与した結果，試験 1 日及び 15 日の検査で，血漿中，CSF 中及び脳中に AHU，LBQ 及び VAL が確認された。試験 1 日に CSF 中新規産生 Aβ42 濃度の高値，試験 15 日に CSF 中新規産生 Aβ38，Aβ40，Aβ42，総 Aβ 濃度の高値が認められた。試験 1 日に標識 Aβ の消失半減期の延長がみられたが，試験 15 日の消失半減期に対照群との差は認められなかった。試験 16 日の脳中 Aβ40 及び Aβ42 濃度に対照群との差は認められなかった。これらの結果から，LBQ の NEP 阻害作用に関連した変化として Aβ 分解が減少したものの，CSF 中 Aβ の血漿中への排泄経路は維持されているものと考えられた。CSF 中と脳中 Aβ 濃度の関連性については，現時点では明らかではない。

### 8.4.2　AHU の骨に対する影響に関する探索的試験

NEP の基質である CNP は，骨形成に関与していることが知られている。CNP を過剰発現させたトランスジェニックマウス（Pejchalova et al. 2007）又はナトリウム利尿ペプチド（natriuretic peptide, NP）の消失に関与する NPR-C 関連遺伝子ノックアウトマウス（Matsukawa et al. 1999）では，骨の過成長，骨格異常又は骨代謝の亢進等の骨に対する影響が認められている。理論的には，AHU の NEP 阻害作用により末梢の CNP 濃度が上昇し，その結果として軟骨成長の亢進が予想されるが，AHU の幼若ラットを用いた試験では骨形成の低下を示唆する変化が認められた。そこ

で，AHU の骨に対する影響についての検討を目的として，ラット骨肉腫細胞株を用いた *in vitro* 試験及び成熟雌ラットを用いた 13 週間反復投与探索的試験を実施した。

### 8.4.2.1 UMR-106 細胞を用いた石灰化に関する試験

本試験 [Table 2.6.7.17B-1170517] は，AHU 及び LBQ による NEP 阻害の骨形成に対する影響を，軟骨形成の指標となる骨細胞石灰化のアッセイ系であるラット骨肉腫細胞株（UMR-106 細胞）を用いた *in vitro* 試験により評価することを目的として GLP 非適用で実施した。本試験では，石灰化及び骨代謝に関連する主要な遺伝子の発現状況，並びに NEP 経路についても検討した。

UMR-106 細胞を，CNP（0.01 nM～1 μM），AHU（0.1～100 μM）又は LBQ（0.1～100 μM），並びに分化誘導剤である β-グリセロリン酸（β-glycerol phosphate，β-GP）存在下で 72 時間培養した。石灰化の測定は，細胞外マトリクスに沈着するヒドロキシアパタイトを測定する OsteoImage Assay を用いて行った。NEP 代謝及び骨形成に関連する主要な遺伝子の発現状況については，β-GP 存在下及び非存在下における CNP（100 nM），LBQ（1 及び 10 μM）及び AHU（1 及び 10 μM）処理細胞における mRNA を RT-qPCR により測定した。UMR-106 細胞から分泌される内因性 CNP についても ELISA により測定した。

β-GP 非存在下では UMR-106 細胞の石灰化がみられなかったことから，CNP，AHU 及び LBQ は単独では石灰化を誘発しないものと考えられた。また，β-GP 処理による石灰化に対して，CNP，AHU 及び LBQ の石灰化阻害作用は認められなかった。

石灰化条件下では低レベルではあったが，CNP をコードする *Nppc* の発現が認められた。*Nppc* の発現は石灰化により軽度の増加がみられたが，AHU 及び LBQ 処理により変化は認められなかった。*Npr3*，*Npr2*，*Mme*，*Phex*，*Alpl*，*Tnfrsf11b* 及び *Bglap* の mRNA レベルに CNP，AHU 及び LBQ 処理の影響は認められなかった。いずれの処理条件下においても NT-proCNP レベルは検出限界未満であり，内因性 CNP への影響は認められなかった。

以上のことから，AHU 及び LBQ は UMR-106 細胞の石灰化に影響を及ぼさないものと考えられた。

### 8.4.2.2 成熟雌ラットを用いた骨形成に関する 13 週間反復投与探索的試験

本試験 [Table 2.6.7.17C-1270139] は，AHU を成熟雌ラットに 13 週間経口投与し，骨への影響及び休薬による回復性を評価することを目的とし GLP 適用で実施した。1 群 10 例の 19 週齢の Wistar 系雌ラットに 0.5% HPC 液に懸濁した AHU を，0，100 及び 400 mg/kg/日の用量で 13 週間反復経口投与した。さらに，各群雌 10 例を回復性試験群として設定し，投与期間終了後 8 週間の休薬により回復性について検討した。また，1 群雌 20 例（10 例は回復性試験群）の陽性対照群には，10% Tween80 溶液に懸濁したメチルプレドニゾロンを 3 mg/kg/日の用量で同様に 13 週間反復経口投与した。本試験では，一般状態観察，体重及び摂餌量測定，血液生化学的検査，尿検査，ホルモン測定（PTH (1-84) intact，1,25-ジヒドロキシビタミン D），骨代謝バイオマーカー

測定（オステオカルシン，P1NP，CTx，デオキシピリジノリン），骨密度測定（DXA，pQCT），剖検，病理組織学的検査（病変部）及びトキシコキネティクスを実施した。

本試験では AHU 投与に関連した死亡はみられず，一般状態，体重，摂餌量，臨床検査値，ホルモン量，剖検及び病理組織学的検査で異常は認められなかった。

骨形態検査では，400 mg/kg/日群で腰椎骨塩量の増加量の軽度の低下が投与 4～5 週の検査でみられ，面積及び骨塩量の軽微な低下傾向，並びに腰椎及び脛骨の骨形状パラメータ（面積，骨膜周囲長及び骨内膜周囲長）の低下が認められた。骨密度及び骨形状パラメータへの影響については，休薬による回復性が認められた。骨代謝パラメータ測定では，対照群と比較して，AHU 投与群でオステオカルシンの減少傾向が認められた。投与期間中に AHU 投与に関連した骨吸収マーカーの変化はみられなかったが，休薬期間終了時に 400 mg/kg/日群で CTx の軽度の増加が認められた。これらの変化は，成熟ラットにおける持続的な骨形成を示唆するものと考えられた。メチルプレドニゾロン投与群では，骨代謝パラメータ測定における変化としてオステオカルシンの低下がみられ，骨形態検査における変化として，全身，腰椎，大腿骨及び脛骨で骨密度及び骨形状パラメータの統計学的に有意な低下が認められた。

トキシコキネティクスでは，用量比例的な AHU 及び LBQ の曝露量の増加が認められた。

以上のとおり，400 mg/kg/日群でみられた成熟雌ラットの骨への影響はメチルプレドニゾロンに比較して軽微であり，毒性学的意義は低いものと考えられた。本試験における AHU 投与に関連した骨への影響に関する無毒性量は，400 mg/kg/日と考えられた。

**Table 8-3　　成熟雌ラットを用いた探索的試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 78 日 | 100 | 雌 | 1020 | 508 | 71200 | 24500 |
| | 400 | 雌 | 4130 | 1080 | 263000 | 70600 |

Source: Table 2.6.7.17C-1270139
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

## 8.5　　不純物

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

＊ 承認情報提供時に置き換えた

規格値までの安全性は既に確認されているものと判断した。なお，その他の不純物（類縁物質C*，類縁物質D* 及び 類縁物質E*）の規格はいずれも[redacted]%以下に設定されており，安全性の確認が必要な閾値以下である。

## 8.6 その他の試験

LCZ の毒性評価において重要な試験ではないが，開発過程で実施した AHU のがん原性試験の予備検討試験を参考資料として示す。

### 8.6.1 AHU のマウスを用いた反復投与毒性試験

マウスを用いた混餌投与による 13 週間反復投与毒性試験では，病理組織学的変化として良性の細気管支・肺胞腺腫が認められた（5.2.1.3 項）。この腫瘍性病変は，背景データの範囲内の発現頻度であり，その発現頻度に用量依存性が認められなかったことから，AHU 投与との関連性は不明であった。この肺病変の AHU 投与との関連性について検討するため，肺腫瘍の発現頻度に関して異なる背景データを有する生育所（Raleigh, NC 及び Kingston, NY）のマウス，及び系統の異なるマウス（B6C3F1 系）を供試した 3 試験の探索的試験を実施した。試験の結果，いずれの試験においても AHU 投与に関連した肺病変は認められなかった。各試験の概要を以下に示す。

#### 8.6.1.1 雄マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験

本試験 [Table 2.6.7.17D-0670079] は，先に実施した AHU のマウスを用いた混餌投与による 13 週間反復投与毒性試験（Table 2.6.7.10B-0570208）でみられた肺病変について確認することを目的として GLP 適用で実施した。1 群 60 例の ICR 系雄マウス（生育所：Raleigh, NC）に，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を 0，2000→1000 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。なお，2000 mg/kg/日の用量では投与 1～2 日に死亡・瀕死例が認められたため，試験 3～7 日は休薬し，試験 8 日から 1000 mg/kg/日に減量して投与を再開した。

本試験では，2000→1000 mg/kg/日群で，試験 1～2 日に 9 例の死亡・瀕死例がみられ，1000 mg/kg/日に減量後は，試験 22～70 日に 6 例が死亡し，試験 10～93 日に 6 例を安楽死処分した。死亡・瀕死の原因は明らかではなかったが，死亡例及び瀕死例の剖検で胃腸管のガス又は被験物質及び飼料の貯留による拡張が認められた。病理組織学的検査では，胃腸管の拡張及び壁菲薄化が認められた。

一般状態の変化として，自発運動低下，削痩，運動失調，正向反射低下／消失，流涙，眼瞼下垂，横臥，円背位，下腹部の汚れ，被毛の汚れ，立毛，粗毛，腹部膨満，腹部表面湿潤，チアノーゼ，蒼白，冷触感，異常呼吸（喘ぎ，浅呼吸，努力性呼吸，ラ音），糞量減少及び被験物質様物質混入便が認められた。体重及び摂餌量に，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。眼科学的検査，血液学的検査及び血液生化学的検査では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

＊承認情報提供時に置き換えた

生存動物の剖検及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。本試験では肺病変はみられず，免疫組織化学検査及び画像解析では II 型肺細胞及びクララ細胞の増殖を示唆する変化は認められなかった。

**Table 8-4　　雄マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 1000 | 雄 | 79000 | 22500 | 485000 | 128000 |
| | 2000 | 雄 | 70900 | 46700 | 663000 | 355000 |
| 試験 79 日 | 1000 | 雄 | 50600 | 73800 | 416000 | 249000 |

Source: Table 2.6.7.17D-0670079
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 8.6.1.2　雄マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験

本試験 [Table 2.6.7.17D-0670080] は，AHU 投与によりマウスでみられた肺病変についての検討を目的として GLP 適用で実施した。先の試験（Table 2.6.7.10B-0570208）の供試マウスとは生育環境の異なる 1 群 60 例の ICR 系雄マウス（生育所：Kingston, NY）に，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を 0 及び 1000 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。

本試験では，AHU 投与に関連した死亡が 1000 mg/kg/日群の 60 例中 8 例で投与 38～75 日にみられた。死亡例の剖検では，胃腸管でガス，液体，又は被験物質と飼料様物質との混合物による拡張がみられ，病理組織学的変化として消化管の壁菲薄化及び内腔拡張が認められたが，8 例中 7 例の死因は明らかにすることはできなかった。死亡又は瀕死例では，一般状態の変化として自発運動の低下，下腹部の汚れ，粗毛，被毛の汚れ，腹部膨満，異常呼吸（努力性呼吸，ラ音），糞量減少，流涙，冷触感及び円背位が認められた。

生存例でも死亡・瀕死例とほぼ同様の一般状態の変化が認められた。体重，摂餌量，眼科学的検査，血液学的検査及び血液生化学的検査では，AHU 投与に関連した変化は認められなかった。剖検及び病理組織学的検査では，AHU 投与に関連した異常は認められなかった。

トキシコキネティクスでは，AHU 投与群のすべてのマウスで曝露が認められた。

以上のとおり，生育環境の異なる ICR 系マウスに AHU を 13 週間反復投与した結果，死亡・瀕死例がみられ，胃腸管の病理組織学的変化が認められたが，AHU 投与に関連した肺病変は認められなかった。

**Table 8-5　　雄マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 1000 | 雄 | 37900 | 8800 | 581000 | 95900 |
| 試験 76 日 | 1000 | 雄 | 44300 | 62700 | 280000 | 313000 |

Source: Table 2.6.7.17D-0670080

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |

単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

### 8.6.1.3 B6C3F1 系マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験

本試験 [Table 2.6.7.17D-0670081] は，AHU 投与によりマウスでみられた肺病変についての検討を目的として GLP 適用で実施した。1 群雌雄各 60 例の B6C3F1/Tac 系マウスに，50 mM リン酸緩衝液に懸濁した AHU を 0 及び 1000→750 mg/kg/日の用量で 13 週間経口投与した。なお，1000 mg/kg/日群では投与 1 日に死亡又は瀕死例が認められたため，試験 2～7 日は休薬し，試験 8 日から 750 mg/kg/日に減量して投与を再開した。

本試験では，1000 mg/kg/日群で，試験 1～2 日に数例の死亡が認められた。750 mg/kg/日群では雄 7 例，雌 18 例の死亡又は瀕死例がみられ，剖検で胃腸管の拡張が認められたが，雄 1 例，雌 11 例については死因を明らかにすることはできなかった。雌 2 例は事故または投与過誤が原因と考えられた。

体重低下及び体重増加の抑制が認められた。飼料の過剰な食べこぼしがみられたため，摂餌量の評価は行わなかった。眼科学的検査では異常は認められなかった。

血液学的検査では，雄で血小板数の増加がみられた。血液生化学的検査では，雌雄でカリウムの増加，雄で BUN の減少，雌で ALP の低下が認められた。

生存例の剖検では，肺を含め異常は認められなかった。

以上のとおり，系統の異なる B6C3F1/Tac 系マウスでは，13 週間反復経口投与による肺病変は認められなかった。

**Table 8-6 B6C3F1 系マウスを用いた 13 週間反復経口投与探索的試験における曝露量の要約**

| 測定日 | 用量 (mg/kg/日) | 性 | AHU | | LBQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | AUC0-24h | Cmax | AUC0-24h | Cmax |
| 試験 1 日 | 1000 | 雄 | 60300 | 8060 | 200000 | 56300 |
| | | 雌 | 88000 | 11600 | 205000 | 70900 |
| 試験 80 日 | 750 | 雄 | 88600 | 131000 | 457000 | 563000 |
| | | 雌 | 49000 | 64700 | 247000 | 369000 |

Source: Table 2.6.7.17D-0670081
単位：AUC0-24h：ng•h/mL；Cmax：ng/mL

# 9 考察及び結論

LCZ の一般毒性試験及び生殖発生毒性試験では，主に本薬の薬理作用に関連した変化が認められた。ラットを用いた 26 週間までの反復投与毒性試験及びサルを用いた 39 週間までの反復投与毒性試験の無毒性量は，いずれの動物種においても 30 mg/kg/日と考えられた。標的器官毒性と

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

LCZ 投与に関連した腎臓の変化（傍糸球体細胞の肥大／過形成）が，ラットでは 200 mg/kg/日以上，サルでは 100 mg/kg/日以上の用量で認められた。同様の変化はアンジオテンシン変換酵素（angiotensin converting enzyme，ACE）阻害薬及び $AT_1$ 受容体拮抗薬の毒性試験でも認められており，薬理作用である $AT_1$ 受容体拮抗作用，輸出細動脈のレニン産生細胞の増加，又は腎血流量低下に対する糸球体濾過量維持のための適応反応に関連した変化と考えられている。LCZ の高用量群（600 mg/kg/日）のサルでは，傍糸球体細胞の肥大に加えて，血圧低下に伴う腎潅流低下及び腎虚血に起因したと考えられる尿細管の変化（好塩基性尿細管，細胞質空胞化，単細胞壊死）が認められた。同様に，VAL のマーモセットを用いた 13 週間反復投与毒性試験の 200 mg/kg/日以上の群でも傍糸球体細胞及び尿細管の変化がみられているが，AHU のラット及びマーモセットを用いた反復投与毒性試験では認められなかった。LCZ 投与によるレニン産生の増加は，低ナトリウム飼料供与によりレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（renin-angiotension-aldosterone system，RAAS）を亢進させたイヌを用いた薬理試験でも確認されており，LCZ 又は VAL 投与群ではレニン産生の増加がみられたのに対し，AHU 投与群では認められなかった。LCZ 投与群におけるレニン増加量は VAL 投与群に比較して低値であった。LCZ と VAL による腎臓の変化の重篤度の違いに関しては，供試したサルの種類及び投与期間が異なるため比較することはできなかった。LCZ の腎臓に対する無毒性量は，ラットでは 100 mg/kg/日，サルでは 30 mg/kg/日（LBQ の予定最高臨床用量における曝露量との比は，いずれも 1 未満）と考えられた。

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

心臓重量の低下が，LCZ を投与したマウス及びラット，並びに AHU 若しくは VAL を投与したラットで認められ，降圧作用に関連した心拍出量及び心室収縮力の低下に伴う心負荷の低下に関連した変化と考えられた。いずれの試験においても，心臓の病理組織学的変化は認められなかった。

LCZ のラットを用いた反復投与毒性試験では，50 mg/kg/日以上の群で可逆的な胃腸管の変化がみられ，病理組織学的変化として腺胃の限局性のびらん及び炎症が認められた。サルでは 30 mg/kg/日以上の群で嘔吐及び下痢がみられたが，関連する病理組織学的変化は認められなかった。胃炎は AHU の局所刺激性に起因した変化と考えられ，AHU の反復投与毒性試験では，ラットでは 50 mg/kg/日以上の群で，マーモセットでは 250 mg/kg/日以上の群で胃の病理組織学的変化

が認められている。LCZ のラットを用いた経口投与及び皮下投与による比較試験により，胃炎と局所刺激性との関連性について検討した。試験の結果，皮下投与群では投与部位の炎症性変化はみられたが胃炎は認められなかったのに対し，経口投与群では腺胃の炎症性細胞浸潤の増加が認められた。LCZ の皮下投与群における AHU，LBQ 及び VAL の曝露量は，経口投与群の曝露量より高値を示したことから，LCZ 投与により発現した胃炎は AHU の刺激性に起因した変化と推察した。さらに，AHU のマウスを用いた LLNA で軽度の刺激性がみられたこと，AHU のウサギを用いた眼一次刺激性試験で刺激性が認められたことも，AHU の刺激性を示唆する結果と考えられる。これらのことから，胃炎に関しては，曝露量ではなく用量比に基づいた安全性評価が適切と考えた。ラットの胃炎に対する LCZ の無毒性量は 30 mg/kg/日であることから，LCZ の予定最高床用量（200 mg を 1 日 2 回）と比較すると約 9 倍の用量比が認められた。また，胃の変化の発現用量は毒性試験ごとに異なり，LCZ のラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験では 100 mg/kg/日群（媒体：0.5% CMC 液）で腺胃のびらん及び炎症性細胞浸潤がみられているが，AHU のラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験では 400 mg/kg/日（媒体：0.5% CMC 液），及び 1200 mg/kg/日（媒体：0.5% HPC 液）まで胃炎はみられず，AHU のラットを用いた 104 週間がん原性では 400 mg/kg/日（媒体：0.5% HPC 液）までの用量で胃炎は認められなかった。これらのことから，AHU の刺激性は使用媒体の種類又は VAL の有無により変化する可能性が考えられたが，胃炎が認められなかった原因が，胃の適応変化によるものか，使用した媒体の違いによるものなのかは明らかではなかった。

ヒトにおける LCZ の主代謝物であり，NEP 阻害作用の活性本体である LBQ の毒性プロファイルは，プロドラッグである AHU のラットを用いた 26 週間までの反復投与毒性試験，マーモセットを用いた 52 週間までの反復投与毒性試験により検討した。これらの試験では，新たな毒性標的器官はみられず，ラット及びマーモセットを用いたいずれの試験においても，良好な忍容性が確認された。AHU のラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験の無毒性量は 600 mg/kg/日であり，LCZ の予定最高臨床用量における LBQ の曝露量と比較すると，AUC0-24h では 1.1 倍，Cmax では 2.9～7.9 倍であった。マーモセットを用いた 52 週間反復投与毒性試験の最大耐量（200 mg/kg/日）群における曝露量比は，AUC0-24h では 1.3～1.6 倍，Cmax では 7.4～8.3 倍であった。

LCZ，AHU 及び LBQ の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験では，染色体構造異常誘発能及び染色体数的異常誘発能は認められなかった。また，VAL の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験でも，VAL の遺伝毒性を示唆する変化は認められなかった。これらのことから，LCZ の遺伝毒性リスクは低いものと考えられた。また，NEP 阻害による理論上のリスクである腫瘍進行に関して，NEP コード遺伝子の変異と腫瘍進行との関連性について *in silico* 解析により評価した結果，LCZ が腫瘍進行に関与する可能性は低いものと考えられた。VAL の用量制限毒性により AHU 及び LBQ の十分な曝露が得られないことが予想されたため，LCZ のがん原性試験は実施しなかった。AHU のマウス及びラットを用いた経口投与による 104 週間がん原性試験では，いずれも高用量群までがん原性を示唆する変化は認められなかった。がん原性に関する無毒性量における LBQ

の曝露量と LCZ の予定最高臨床用量における LBQ の曝露量とを比較すると，マウスでは AUC で 1.7 倍以上，Cmax で 14 倍以上，ラットでは AUC で 0.7 倍以上，Cmax で 3.3 倍以上の差が認められた。VAL のマウス及びラットを用いた混餌投与による 104 週間がん原性試験では，がん原性を示唆する変化は認められなかった。これらのことから，LCZ のがん原性リスクは低いものと考えられた。

LCZ の雌雄ラットの受胎能に対する影響は認められなかった。LCZ のラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，ラット及びウサギで胚・胎児致死作用を含む胚・胎児毒性がみられ，ウサギでは 10 mg/kg/日以上の群で水頭症が認められた。VAL のウサギを用いた胎児の器官形成期投与試験では，母動物毒性発現用量である 5 mg/kg/日以上の群で胎児の低体重に関連した側脳室拡張の発現頻度の増加がみられていることから，水頭症は VAL 投与に関連した変化である可能性が考えられた。AHU 及び VAL では胎児毒性及び胚・胎児致死作用がウサギで認められている。LBQ による十分な曝露量を得るために AHU 投与によるラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験を実施した。試験の結果，AHU 投与に関連した変化として，750 mg/kg/日群の出生児で離乳までの体重の低値がみられたが，出生児の生存，行動及び生殖能に対する影響は認められなかった。母動物に関する無毒性量は 750 mg/kg/日，出生児に関する無毒性量は 250 mg/kg/日と考えられた。VAL のラットを用いた周産期及び授乳期投与試験では，出生児の発生及び生存率の低下が認められた。

生殖発生毒性試験の結果から，妊娠中のヒトへの LCZ 投与による胎児毒性発現リスクが示唆された。妊娠第 2 三半期及び第 3 三半期における RAAS 阻害薬の使用により，胎児の腎機能低下，並びに胎児及び新生児の罹病率及び死亡の増加が報告されている。RAAS 阻害薬の使用により生じる羊水過少症により，胎児の肺の形成不全，骨格異常，頭蓋骨形成不全，無尿症及び低血圧が発現する可能性が考えられる（Serreau et al. 2004，Darby et al. 2013）。したがって，他の阻害剤と同様に，妊娠中の本剤の使用は禁忌とすることが適切と考えた。妊娠の可能性のある女性では，妊娠していないことが明らかであり，有効な避妊法を使用している場合に限り本剤の使用が可能である。一方，LCZ 及びその代謝物の精液中への移行量は極めて低く，精液を介した母体における曝露量は，ラット及びウサギの胚・胎児死亡及び催奇形性に関する無毒性量における曝露量の 500 分の 1 程度と予測されることから，男性患者の避妊は必要ではないと判断した。

AHU 又は VAL の幼若動物を用いた試験の結果から，LCZ の幼若動物における毒性標的器官として腎臓及び骨が考えられた。VAL の幼若ラットを用いた毒性試験では，すべての用量で腎尿細管及び腎盂の変化が認められたため無毒性量を設定することはできなかった。新生児における腎臓の変化は，ACE 阻害薬及び $AT_1$ 受容体拮抗薬で予想される薬理作用の過剰発現によるものであり，ラットの腎形成期間である生後 13 日までにこれらの薬剤を投与した場合に認められる。ヒトでは出生時までに腎形成がほぼ完了しているため，1 歳未満の乳児において懸念される事象である。NEP 阻害による理論上のリスクとして骨格の過形成及び骨格異常が考えられるため（Matsukawa 1999，Chusho et al. 2001，Bartels et al. 2004，Ozawa et al. 2005，Pejchalova 2007），

AHU の幼若動物を用いた毒性試験により検討した。試験の結果，幼若ラットでは 800 mg/kg/日群でごく軽度の骨長の減少（大腿骨及び脛骨）がみられ，400 mg/kg/日以上の群で骨量の低下が認められた。骨への影響は生後 21 日に最も顕著であり，一過性の変化であることから，骨端軟骨板閉鎖までには成長遅滞を補うための十分な期間があることが示唆された。生後 21 日は LBQ657 の曝露量も高く，体重増加量の低下も顕著であった。AHU 投与でみられた骨の変化は，NP 受容体 C（natriuretic peptide receptor C，NPR-C）経路の阻害により予測されるものとは逆の変化であり，NEP 阻害による CNP の変化も認められなかった。*In vitro* 試験では，UMR-106 細胞の石灰化への影響も認められなかった。これらのことから，幼若ラットで認められた骨の変化は NEP 又は CNP-NPR-C 経路の阻害に関連したものではなく，AHU の体重増加（身体的発達）に対する影響の二次的変化である可能性が考えられた。AHU の幼若ウサギを用いた毒性試験及び成熟雌ラット（19 週齢）を用いた探索的試験では，骨への影響は認められなかった。

LCZ の NEP 阻害作用に関連した理論上のリスクとして，NEP の基質であるブラジキニン，Aβ 及び CNP の上昇により，それぞれ血管浮腫，Aβ クリアランスの低下及び脳内蓄積，並びに骨の成長促進及び骨形成異常が発現する可能性が考えられる。非臨床試験では，Aβ 代謝への影響を除いて，これらに関連した変化は認められなかった。また，NP の増加に伴う NP 受容体 A（NPR-A）活性上昇に関連した理論上のリスクとして，脂肪分解の促進が考えられるが，LCZ 及び AHU の反復投与毒性試験では関連した変化は認められなかった。したがって，これらの理論上のリスクが，ヒトで発現する可能性は低いものと推察した。

Aβ 代謝への影響についての検討を目的としたカニクイザルを用いた SILK-Aβ assay による探索的試験では，LCZ を 50 mg/kg/日の用量（400 mg を投与したヒトの血漿及び CSF 中 LBQ 濃度に相当）で 2 週間反復経口投与した結果，試験 1 日に CSF 中 Aβ（38，40，42）の消失半減期の延長及び CSF 中新規産生 Aβ42 の有意な増加がみられた。試験 15 及び 16 日には，CSF 中新規産生 Aβ（38，40，42 及び総 Aβ 濃度）の増加及び血漿中 Aβ（40，42）濃度の増加が認められた。試験 15 日の検査では CSF 中 Aβ の消失半減期に対照群との差はみられず，試験 16 日の検査では脳中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の増加も認められなかった。これらの結果は，LBQ の NEP 阻害作用に関連して Aβ の分解酵素によるクリアランスが低下したためと考えられた。一方，試験 15 日の Aβ 消失半減期に差がみられなかったこと，並びに試験 16 日の脳中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の増加が認められなかったことは，CSF から血漿中に移行する Aβ の消失経路が維持されていることを示唆するものと考えられた。

サルを用いた探索的試験において，脳中 Aβ40 及び Aβ42 濃度の増加が認められなかったことは，LCZ のサルを用いた 39 週間反復投与毒性試験の 300 mg/kg/日群（予定最高臨床用量におけるヒト LBQ 曝露量と比較して，AUC で 1.9～2.2 倍，Cmax で 8.5～8.8 倍）における検査結果と一致していた。すなわち，同群では，抗 Aβ42 抗体を用いた免疫組織化学的検査において，脳の病理組織学的変化，脳血管における染色領域あるいはアミロイド斑形成は認められなかった。

LCZ のヒト予定最高臨床用量（200 mg を 1 日 2 回）における曝露量をTable 9-1に示す。LCZ のラット，マウス及びサルを用いた毒性試験の曝露量とヒトの曝露量との比較をTable 9-2に，AHU のラット，マウス及びマーモセットを用いた毒性試験の曝露量とヒトの曝露量との比較をTable 9-3に示す。LCZ のラット及びサルを用いた毒性試験の無毒性量における AHU，LBQ 及び VAL の曝露量は，予定最高臨床用量におけるヒト曝露量に比較して概ね低値を示したが，サルを用いた試験の最大耐量における LBQ 及び VAL の曝露量は，ヒト曝露量に比較して高値であった。AHU の反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験では，LCZ の試験と比較すると高い曝露量比が得られた。曝露量比の低値は，蛋白結合，プロドラッグの変換，分布容積及び消失における動物種差を反映したものと考えられた。非臨床毒性試験の無毒性量設定の根拠とした毒性変化は胃腸管，腎臓及び赤血球系パラメータの変化であるが，LCZ の臨床試験において赤血球系パラメータの変化はみられず，胃腸管及び腎臓の変化に関連した有害事象は認められるもののその発現率は低く，LCZ の長期投与に伴ってその発現率が高くなる傾向は認められなかった。

以上のとおり，非臨床試験で認められた LCZ 投与に関連した変化は，主として薬理作用に関連したものであり，いずれも回復性若しくは回復傾向が認められ，臨床でのモニターが可能な変化と考えられた。LCZ に遺伝毒性及びがん原性は認められなかった。催奇形性及び胚・胎児致死作用を含む胚・胎児毒性が認められたことから，妊婦での使用は制限され，妊娠可能な女性では効果的な避妊法が必要とされる。非臨床安全性試験で得られた結果に加えて，ヒト臨床における良好な忍容性及び有効性を考慮すると，慢性心不全の治療において，予定されている用法・用量の範囲内で，添付文書案に従って LCZ を使用することは妥当と判断した。

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

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

Source: A2117 試験，B2223 試験
単位：AUC0-12h = ng•hr/mL，Cmax = ng/mL
測定値は 43 例の患者の平均値を示す

**Table 9-2 LCZ の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比**

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

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

単位： AUC0-24h = ng•hr/mL, Cmax = ng/mL

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

a = 投与期間終了時の測定値

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

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

**Table 9-3 AHU の毒性試験の無毒性量／最大耐量における曝露量比**

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

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

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

単位： AUC0-24h = ng•hr/mL, Cmax = ng/mL

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

a = 投与期間終了時の測定値

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

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

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

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

f = 胚・胎児発生に関する無毒性量

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

# 10 参考文献

[Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, et al. (2004)] Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. Am. J. Hum. Genet; 75:27-34.

[Chang CQ, Yesupriya A, Rowell JL, et al. (2014)] A systematic review of cancer GWAS and candidate gene meta-analyses reveals limited overlap but similar effect sizes. Eur J Hum Genet; 22(3):402-8.

[Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, et al. (2001)] Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A; 98(7):4016-21.

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

[Cook JJ, Wildsmith KR, Gilberto DB, et al. (2010)] Acute γ-secretase inhibition of nonhuman primate CNS shifts amyloid precursor protein (APP) metabolism from amyloid-β production to alternative APP fragments without amyloid-β rebound. J Neurosci; 30(19):6743-50.

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

[Debiec H, Nauta J, Coulet F, et al. (2004)] Role of truncating mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunisation and antenatal glomerulopathies. Lancet; 364(9441):1252-9.

[Freudenthaler SM, Schreeb K, Korner T, et al. (1999)] Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers. Eur J Clin Invest; 29(10):816-23.

[Goodman O, Febbraio M, Simantov R, et al. (2006)] Neprilysin inhibits angiogenesis via proteolysis of fibroblast growth factor-2. J Biol Chem; 281(44):33597-605.

[Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011)] The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. Nat Rev Drug Discov; 10(9):698-712.

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

[Li W, Wu Y, Min F, et al. (2010)] A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid-β42 and thiorphan. Metab Brain Dis; 25(3):277-84.

[Marr RA and Spencer BJ (2010)] Diabetes NEP-like endopeptidases and Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res; 7(3):223-9.

[Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, et al. (1999)] The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. Proc Natl Acad Sci U S A; 96(13):7403-8.

[Moro ML, Giaccone G, Lombardi R, et al. (2012)] APP mutations in the Aβ coding regions are associated with abundant cerebral deposition of Aβ38. Acta Neuropathol; 124(6):809-21.

[Ozasa A, Komatsu Y, Yasoda A, et al. (2005)] Complementary antagonistic actions between C-type natriuretic peptide and the MAPK pathway through FGFR-3 in ATCD5 cells. Bone; 36(6):1056-64.

[Patel JN, McLeod HL, Innocenti F (2013)] Implications of genome-wide association studies in cancer therapeutics. Br J Clin Pharmacol; 76(3):370-80.

[Pejchalova K, Krejci P, Wilcox WR (2007)] C-natriuretic peptide: An important regulator of cartilage. Mol Genet Metab; 92(3):210-5.

[Podlisny MB, Tolan DR, Selkoe DJ (1991)] Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. Am J Pathol; 138(6):1423-35.

[Saido T and Leissring MA (2012)] Proteolytic degradation of amyloid β protein. Cold Spring Harb Perspect Med; 2(6):a006379.

[Serreau R, Luton D, Macher M-A (2004)] Developmental toxicity of the angiotensin II type 1 receptor antagonists during human pregnancy: a report of 10 cases. BJOG; 112(6):710-2.

[Stadler ZK, Thom P, Robson ME, et al. (2010)] Genome-wide association studies of cancer. J Clin Oncol; 28(27):4255-67.

[Woodruff-Pak DS (2008)] Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. J Alzheimers Dis; 15(4): 507-21.

# 2.6.7 毒性試験概要表

# 目　次

目　次 ..... 2
略号一覧 ..... 5
2.6.7.1 毒性試験一覧 ..... 6
2.6.7.2 トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表 ..... 13
2.6.7.2 A トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表（LCZ696） ..... 13
2.6.7.2 B トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表（AHU377） ..... 14
2.6.7.2 C トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表（valsartan） ..... 16
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表 ..... 17
2.6.7.3 A トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696） ..... 17
2.6.7.3 B トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696） ..... 20
2.6.7.3 C トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696） ..... 23
2.6.7.3 D トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377） ..... 26
2.6.7.3 E トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377） ..... 31
2.6.7.3 F トキシコキネティクス試験成績一覧表（valsartan，幼若ラット） ..... 36
2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬／不純物 ..... 37
2.6.7.5 単回投与毒性試験 ..... 39
2.6.7.5 A 単回投与毒性試験 ..... 39
2.6.7.5 B 単回投与毒性試験 ..... 40
2.6.7.6 反復投与毒性試験 ..... 41
2.6.7.6 A 反復投与毒性試験 ..... 41
2.6.7.6 B 反復投与毒性試験 ..... 43
2.6.7.7 反復投与毒性試験 ..... 46
2.6.7.7 A 反復投与毒性試験 ..... 46
2.6.7.7 B 反復投与毒性試験 ..... 50
2.6.7.7 C 反復投与毒性試験 ..... 53
2.6.7.7 D 反復投与毒性試験 ..... 56
2.6.7.7 E 反復投与毒性試験 ..... 59
2.6.7.7 F 反復投与毒性試験 ..... 64
2.6.7.7 G 反復投与毒性試験 ..... 66
2.6.7.7 H 反復投与毒性試験 ..... 70
2.6.7.7 I 反復投与毒性試験 ..... 72
2.6.7.7 J 反復投与毒性試験 ..... 75
2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験 ..... 77
2.6.7.8 A *In vitro* 遺伝毒性試験 ..... 77
2.6.7.8 B *In vitro* 遺伝毒性試験 ..... 81

2.6.7.8 C *In vitro* 遺伝毒性試験 84
2.6.7.8 D *In vitro* 遺伝毒性試験 86
2.6.7.8 E *In vitro* 遺伝毒性試験 89
2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験 92
2.6.7.9 A *In vivo* 遺伝毒性試験 92
2.6.7.9 B *In vivo* 遺伝毒性試験 93
2.6.7.10 がん原性試験 94
2.6.7.10 A がん原性試験（用量設定試験） 94
2.6.7.10 B がん原性試験（用量設定試験） 95
2.6.7.10 C がん原性試験（用量設定試験） 97
2.6.7.10 D がん原性試験 99
2.6.7.10 E がん原性試験 107
2.6.7.11 生殖発生毒性試験 115
2.6.7.11 A 生殖発生毒性試験 115
2.6.7.11 B 生殖発生毒性試験 116
2.6.7.12 生殖発生毒性試験 117
2.6.7.12 A 生殖発生毒性試験 117
2.6.7.12 B 生殖発生毒性試験 119
2.6.7.13 生殖発生毒性試験 121
2.6.7.13 A 生殖発生毒性試験 121
2.6.7.13 B 生殖発生毒性試験 124
2.6.7.13 C 生殖発生毒性試験 127
2.6.7.13 D 生殖発生毒性試験 129
2.6.7.14 生殖発生毒性試験 132
2.6.7.14 A 生殖発生毒性試験 132
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 136
2.6.7.15 A 幼若ラットを用いた用量設定試験 136
2.6.7.15 B 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（AHU377） 137
2.6.7.15 C 幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験（AHU377） 142
2.6.7.15 D 幼若ウサギを用いた反復投与毒性試験（AHU377） 148
2.6.7.15 E 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（valsartan） 150
2.6.7.16 局所刺激性試験 153
2.6.7.16 A 局所刺激性試験 153
2.6.7.16 B 局所刺激性試験 154
2.6.7.17 その他の毒性試験 155
2.6.7.17 A その他の毒性試験－Aβ 代謝への影響 155

2.6.7.17 B その他の毒性試験－骨への影響 ..... 161
2.6.7.17 C その他の毒性試験－骨への影響 ..... 162
2.6.7.17 D その他の毒性試験－その他の試験（AHU377 のマウスを用いた反復投与毒性試験） ..... 167
2.6.7.17 E その他の毒性試験－その他の試験（*in silico* 解析） ..... 168

# 略号一覧

| 略号 | 省略していない表現（英） | 省略していない表現（日） |
|---|---|---|
| Aβ | amyloid beta | アミロイドβ |
| ALP | alkaline phosphatase | アルカリホスファターゼ |
| ALT | alanine aminotransferase | アラニンアミノトランスフェラーゼ |
| AST | aspartate aminotransferase | アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ |
| AUC | area under the drug serum concentration-time curve | 血清中薬物濃度-時間曲線下面積 |
| BMC | bone mineral content | 骨塩量 |
| BMD | bone mineral density | 骨密度 |
| BUN | blood urea nitrogen | 血液尿素窒素 |
| Cmax | maximum serum concentration after a single dose | 最高血清中薬物濃度 |
| CMC | carboxymethylcellulose | カルボキシメチルセルロース |
| CNP | C-type natriuretic peptide | C 型ナトリウム利尿ペプチド |
| CTx | C-telopeptide | C テロペプチド |
| DMSO | dimethyl sulfoxide | ジメチルスルホキシド |
| DPD | deoxypyridinoline | デオキシピリジノリン |
| DXA | dual-energy x-ray absorptiometry | 2 重エネルギーエックス線吸収測定法 |
| G | gestation day | 妊娠日数 |
| GI | gastrointestinal | 胃腸の |
| 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 |
| HPC | hydroxypropyl cellulose | ヒドロキシプロピルセルロース |
| L | lactation day | 授乳日数 |
| LLNA | local lymph node assay | 局所リンパ節測定法 |
| 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 |
| NM-PCE | micronucleated polychromatic erythrocytes | 小核を有する多染性赤血球 |
| NOAEL | no observed adverse-effect level | 無毒性量 |
| P1NP | procollagen type I N-terminal propeptide | I 型プロコラーゲン架橋 N-プロペプチド |
| PCE | polychromatic erythrocytes | 多染性赤血球 |
| pp | post-partum day | 出生後日数 |
| pQCT | peripheral quantitative computed tomography | 末梢骨定量コンピュータ断層法 |
| QA | Quality Assurance | 信頼性保証部門 |
| RBC | red blood cell | 赤血球 |

## 2.6.7.1 毒性試験一覧

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg[a]) | GLP compliance | Testing facility | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Single dose toxicity: AHU377 | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | - | 0, 50,250, 1000, 2000 | Yes | [redacted] | [0480024] | 4.2.3.1-1 |
| | Mouse, CD-1 | Intraperitoneal | - | 0, 25, 50, 300, 500 | Yes | [redacted] | [0480022] | 4.2.3.1-2 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | - | 0, 50, 250, 1000, 2000 | Yes | [redacted] | [0480025] | 4.2.3.1-3 |
| | Rat, Han Wistar | Intraperitoneal | - | 0, 25, 50, 300, 500 | Yes | [redacted] | [0480023] | 4.2.3.1-4 |
| Repeated-dose toxicity: LCZ696 | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 2-week | 0, 50, 200, 400, 800 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0670221] | 4.2.3.2-1 |
| | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 13-week | 0, 50, 100, 200, 400 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670524] | 4.2.3.2-2 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 2-week | 0, 50, 200, 600, 1200 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670220] | 4.2.3.2-3 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 2-week | 0, 10, 30 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670468] | 4.2.3.2-4 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 13-week | 0, 10, 30, 100 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670283] | 4.2.3.2-5 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 26-week | 0, 10, 30, 100 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670620] | 4.2.3.2-6 |
| | Monkey, Cynomolgus | Oral (gavage) | 1-week | 0, 25, 100 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670259] | 4.2.3.2-7 |
| | Monkey, Cynomolgus | Oral (gavage) | 2-week | 0, 50, 100, 300, 600 | No | Novartis E. Hanover, NJ | [0670276] | 4.2.3.2-8 |
| | Monkey, Cynomolgus | Oral (gavage) | 13-week | 0, 30, 100, 300 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670282] | 4.2.3.2-9 |
| | Monkey, Cynomolgus | Nasal (gavage) | 39-week | 0, 30, 100, 300 | Yes | [redacted] | [0670621] | 4.2.3.2-10 |

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg[a]) | GLP compliance | Testing facility | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Repeated-dose toxicity: AHU377 | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 5-day | 0, 1000, 1500 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0670138] | 4.2.3.2-11 |
| | Mouse, B6C3F1 | Oral (gavage) | 1-week | 0, 500, 750 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0670159] | 4.2.3.2-12 |
| | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 2-week | 0, 250(M), 500, 1500 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0570150] | 4.2.3.2-13 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 1-week | 0, 50, 250, 1000 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0370107] | 4.2.3.2-14 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 2-week | 0, 10, 50, 150 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0470084] | 4.2.3.2-15 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 2-week | 0, 250, 500, 1000, 2000 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0670107] | 4.2.3.2-16 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 13-week | 0, 50,100, 200, 400 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0570207] | 4.2.3.2-17 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 4- and13-week | 0, 400, 800, 1200 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0770711] | 4.2.3.2-18 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 26-week | 0, 50, 150, 600 | Yes | [redacted] Canada | [1370484] | 4.2.3.2-19 |
| | Monkey, Marmoset | Oral (gavage) | 1-week | 0, 50, 250, 500 | Yes (partially) | Novartis, E. Hanover, NJ | [0370097] | 4.2.3.2-20 |
| | Monkey, Marmoset | Oral (gavage) | 52-week | 0, 25, 100, 200 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0570307] | 4.2.3.2-21 |

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg[a]) | GLP compliance | Testing facility | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Genotoxicity: LCZ696 | *S. typhimurium* | *In vitro* | - | Plate incorporation:<br>±S9: 5~5000 µg/plate<br>Preincubation:<br>±S9: 312.5~5000 µg/plate | Yes | Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland | [0612017] | 4.2.3.3.1-1 |
| | Human lymphocytes | *In vitro* | - | 3hr+17hr recovery,<br>-S9: 300~1300 µg/mL<br>3hr+17hr recovery,<br>+S9: 1100~1800 µg/mL<br>+S9: 1000~2000 µg/mL<br>20+0hr,<br>-S9: 100~300 µg/mL | Yes | [redacted] England | [0770050] | 4.2.3.3.1-2 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 2 days | 0, 500, 1000, 2000 | Yes | [redacted] England | [0770051] | 4.2.3.3.2-1 |
| Genotoxicity: AHU377 | *S typhimurium* | *In vitro* | - | Plate incorporation:<br>±S9: 8~5000 µg/plate<br>Preincubation:<br>±S9: 312.5~5000 µg/plate | Yes | Novartis, Pharma AG Basel, Switzerland | [0412008] | 4.2.3.3.1-3 |
| | Human lymphocytes | *In vitro* | - | 3hr+24 hr,<br>±S9: 33~333 µg/mL<br>24hr+24hr,<br>-S9: 100~500 µg/mL | Yes | [redacted] The Netherlands | [0420038] | 4.2.3.3.1-4 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 2 days | 0, 125, 395 1250 mg/kg | Yes | Novartis, Pharma AG Basel, Switzerland | [0412409] | 4.2.3.3.2-2 |
| Genotoxicity: LBQ657 | Human lymphocytes | *In vitro* | - | 3hr+17 hr,<br>-S9: 1200~2400 µg/mL<br>+S9: 1200~3400 µg/mL<br>20hr+0hr,<br>-S9: 300~1400 µg/mL | Yes | [redacted] England | [1170562] | 4.2.3.3.1-5 |

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg[a]) | GLP compliance | Testing facility | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Carcinogenicity: LCZ696 | NA[b] | | | | | | | |
| Carcinogenicity: AHU377 | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 1-week | 0, 400, 800, 1200 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0770781] | 4.2.3.4.1-1 |
| | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 4-week | 0, 200, 400, 800, 1200 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0770782] | 4.2.3.4.1-2 |
| | Mouse, CD-1 | Oral (feed) | 13-week | 0, 100, 250, 500, 1000, 2000 | Yes | Novartis, E. Hanover NJ | [0570208] | 4.2.3.4.1-3 |
| | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 13-week | 0, 400, 800, 1200 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0770896] | 4.2.3.4.1-4 |
| | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 104-week | 0, 150, 400, 1200 | Yes | [redacted] Canada | [0870374] | 4.2.3.4.1-5 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 104-week | 0, 50, 150, 400 | Yes | [redacted] Canada | [0870373] | 4.2.3.4.1-6 |
| Reproductive and development toxicity: LCZ696[c]: | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | D | 0, 10, 50, 150 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0970613] | 4.2.3.5.1-1 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | G6-G17[e] | 0, 30, 100, 200 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670390] | 4.2.3.5.2-1 |
| | Rabbit, NZW | Oral (gavage) | G7-G20[e] | 0,1, 3, 10, 30, 100 | No | Novartis E. Hanover, NJ | [0670279] | 4.2.3.5.2-2 |
| | Rabbit, NZW | Oral (gavage) | G7-G20[e] | 0, 3, 10, 30 | Yes | Novartis E. Hanover, NJ | [0670280] | 4.2.3.5.2-3 |

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg[a]) | GLP compliance | Testing facility | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reproductive and development toxicity AHU377 | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | d | 0, 75, 250, 750 | Yes | [redacted] Canada | [1370483] | 4.2.3.5.1-2 |
| | Rats, Han Wistar | Oral (gavage) | G6-17 [e] | 0, 75, 250, 750 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0570301] | 4.2.3.5.2-4 |
| | Rabbits, NZW | Oral (gavage) | G7-20 [e] | 0, 10, 50, 100, 200 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0570143] | 4.2.3.5.2-5 |
| | Rabbits, NZW | Oral (gavage) | G7-20 [e] | 0, 200, 500, 1000 | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [0570339] | 4.2.3.5.2-6 |
| | Rabbits, NZW | Oral (gavage) | G7-20 [e] | 0, 15, 50, 200, 500 | Yes | Novartis, E. Hanover, NJ | [0770644] | 4.2.3.5.2-7 |
| | Rats, Han Wistar | Oral (gavage) | G7-L22 [e] | 0, 50, 250, 750 | Yes | [redacted] Canada | [1070349] | 4.2.3.5.3-1 |
| Juvenile animal toxicity: AHU377 | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | PP7-34 [e] | 0, 100, 400, 800 | No | [redacted] Canada | [0870735] | 4.2.3.5.4-1 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | PP7-70 [e] | 0, 100, 400, 800 | Yes | [redacted] Canada | [0870734] | 4.2.3.5.4-2 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | PP7-34 [e] | 0, 100, 400, 800 | Yes | [redacted] Canada | [1170516] | 4.2.3.5.4-3 |
| | Rabbit, NZW | Oral (gavage) | PP28-56 [e] | 0, 5, 50, 150 | Yes | [redacted] Canada | [1170514] | 4.2.3.5.4-4 |
| Juvenile animal toxicity: valsartan | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | PP7-70 [e] | 0, 1, 20, 150 | Yes | [redacted] Canada | [0680270] | 4.2.3.5.4-5 |

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg[a]) | GLP compliance | Testing facility | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Local tolerance: LCZ696 | Rat, Han Wistar | Subcutaneous injection | 3-day | 200 mg/kg | No | Novartis E. Hanover, NJ | [0670623] | 4.2.3.6-1 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) , subcutaneous | 2-week | 0, 200 (oral, SQ) | No | Novartis E. Hanover, NJ | [0670624] | 4.2.3.6-2 |
| Local tolerance: Contact sensitizing potential (LLNA tier 1): AHU377 | Mouse, BALB/c | Dermal | 3 days | 0, 0.5, 5, 50% | Yes | [redacted] The Netherlands | [0770750] | 4.2.3.6-3 |
| Local tolerance: Primary skin irritation/corrosion study: AHU377 | Rabbit, NZW | Dermal, Semi occlusive | 4 hours | 0.5 g | Yes | [redacted] The Netherlands | [0770751] | 4.2.3.6-4 |
| Local tolerance: Acute eye irritation/corrosion study: AHU377 | Rabbit, NZW | Ocular | - | 0, 30.5 mg | Yes | [redacted] The Netherlands | [0770752] | 4.2.3.6-5 |
| Other studies: Investigative amyloid β clearance studies with LCZ696 | Monkey, Cynomolgus | Oral | 16-day | 0, 50 | No | [redacted] Canada | [1270586, 1270586A] | 4.2.3.7.3-1-1 4.2.3.7.3-1-2 |
| Other studies: Investigative bone studies with AHU377 | UMR106 osteosarcoma cells | *In vitro* | - | AHU377: 0.1-100 µM LBQ657: 0.1-100 µM | No | Novartis, Cambridge, MA | [1170517] | 4.2.3.7.3-2 |
| | Rat, Han Wistar | Oral (gavage) | 13-week | 0, 100, 400 | Yes | [redacted] Canada | [1270139] | 4.2.3.7.3-3 |
| Other studies: Mouse studies with AHU377 | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 13-week | 0, 2000/1000 | Yes | Novartis, E. Hanover NJ | [0670079] | 4.2.3.7.7-1 |
| | Mouse, CD-1 | Oral (gavage) | 13-week | 0, 1000 | Yes | Novartis, E. Hanover NJ | [0670080] | 4.2.3.7.7-2 |
| | Mouse, B6C3F1 | Oral (gavage) | 13-week | 0, 1000/750 | Yes | Novartis, E. Hanover NJ | [0670081] | 4.2.3.7.7-3 |

| Study type | Species and strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg[a]) | GLP compliance | Testing facility | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Other toxicity study: *in silico* evaluation on tumor progression | NA | *In silico* | NA | NA | No | Novartis, E. Hanover, NJ | [1470340] | 4.2.3.4.3-1 |

a = Unless otherwise specified. For Repeated-Dose Toxicity, the highest NOAEL (no observed adverse-effect level) is underlined.

b = No carcinogenicity studies were performed with LCZ696 due to low exposure multiples achieved relative to clinical exposure. Instead, carcinogenicity assessment for LCZ696 based on carcinogenicity studies with AHU377 and valsartan.

c = No pre- and post natal development studies (PPND), and no juvenile toxicity studies were performed with LCZ696 due to low exposure multiples which would be achieved due renal toxicity associated with valsartan component. Instead, PPND and juvenile toxicity assessments for LCZ696 are based on studies with AHU377 and valsartan.

d = Males: 4-weeks prior to mating; Females: 2-weeks prior to mating through Gestation Day 6.

e = G: Gestation day; L: Lactation day; PP: Post-partum day

## 2.6.7.2 トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表

## 2.6.7.2 A トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表（LCZ696）

| Study type | Species | Strain | Method of administration | Doses (mg/kg) | GLP compliance | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Repeated dose toxicity; 2 week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 50, 200, 400, 800 | No | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| Repeated dose toxicity; 13-week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 50, 100, 200, 400 | Yes | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| Repeated dose toxicity; 2-week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 50, 200, 600, 1200 | Yes | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| Repeated dose toxicity; 2-week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 10, 30 | Yes | 0670468 | 4.2.3.2-4 |
| Repeated dose toxicity; 13-week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 10, 30, 100 | Yes | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| Repeated dose toxicity; 26-week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 10, 30, 100 | Yes | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| Repeated dose toxicity; 1 week | Monkey | Cynomolgus | Oral (gavage) | 0, 25, 100 | Yes | 0670259 | 4.2.3.2-7 |
| Repeated dose toxicity; 2-week | Monkey | Cynomolgus | Oral (gavage) | 0, 50, 100, 300, 600 | No | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| Repeated dose toxicity; 13-week | Monkey | Cynomolgus | Oral (gavage) | 0, 30, 100, 300 | Yes | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| Repeated dose toxicity; 39-week | Monkey | Cynomolgus | Nasal (gavage) | 0, 30, 100, 300 | Yes | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| Reproductive and developmental toxicity; embryo-fetal development | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 30, 100, 200 | Yes | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| Reproductive and developmental toxicity; embryo-fetal development | Rabbit | NZW | Oral (gavage) | 0, 3, 10, 30 | Yes | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| Other toxicity studies- 3 day subcutaneous tolerability | Rat | Han Wistar | Subcutaneous | 0, 200 | No | 0670623 | 4.2.3.6-1 |
| Other toxicity studies -16-day study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta | Monkey | Cynomolgus | Oral (gavage) | 0, 50 mg | No | 1270586 | 4.2.3.7.3-1 |

## 2.6.7.2 B　トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表（AHU377）

| Study type | Species | Strain | Method of administration | Doses (mg/kg) | GLP compliance | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Repeated dose toxicity; 2 week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 250, 500, 1500 | No | 0570150 | 4.2.3.2-13 |
| Repeated dose toxicity; 1 week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 50, 250, 1000 | No | 0370107 | 4.2.3.2-14 |
| Repeated dose toxicity; 2 week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 10, 50, 150 | No | 0470084 | 4.2.3.2-15 |
| Repeated dose toxicity; 2 week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 250, 500, 1000, 2000 | No | 0670107 | 4.2.3.2-16 |
| Repeated dose toxicity; 13 week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 50, 100, 200, 400 | Yes | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| Repeated dose toxicity; 4/13 week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 400, 800, 1200 | Yes | 0770711 | 4.2.3.2-18 |
| Repeated dose toxicity; 26 week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 50, 150, 600 | Yes | 1370484 | 4.2.3.2-19 |
| Repeated dose toxicity; 1 week | Monkey | Marmoset | Oral (gavage) | 0, 50, 250, 500 | Yes | 0370097 | 4.2.3.2-20 |
| Repeated dose toxicity; 52 week | Monkey | Marmoset | Oral (gavage) | 0, 25, 100, 200 | Yes | 0570307 | 4.2.3.2-21 |
| Carcinogenicity DRF; 1 week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 400, 800, 1200 | No | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| Carcinogenicity DRF; 4-week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 200, 400, 800, 1200 | Yes | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| Carcinogenicity DRF; 13 week | Mouse | CD-1 | Oral (feed) | 0, 100, 250, 500 1000, 20000 | Yes | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| Carcinogenicity DRF; 13 week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 400, 800, 1200 | Yes | 0770896 | 4.2.3.4.1-4 |
| Carcinogenicity; 104 week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 150, 400, 1200 | Yes | 0870374 | 4.2.3.4.1-5 |
| Carcinogenicity; 104 week | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 50, 150, 400 | Yes | 0870373 | 4.2.3.4.1-6 |
| Reproductive and developmental toxicity; embryo-fetal development | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 75, 250, 750 | Yes | 0570301 | 4.2.3.5.2-4 |
| Reproductive and developmental toxicity; embryo-fetal development | Rabbit | NZW | Oral (gavage) | 0, 15, 50, 200, 500 | Yes | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| Reproductive and developmental toxicity; juvenile toxicity | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 100, 400, 800 | Yes | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| Reproductive and developmental toxicity; juvenile toxicity | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 100, 400, 800 | Yes | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| Reproductive and developmental toxicity; juvenile bone toxicity | Rabbit | NZW | Oral (gavage) | 0, 5, 50, 150 | Yes | 1170514 | 4.2.3.5.4-4 |

| Study type | Species | Strain | Method of administration | Doses (mg/kg) | GLP compliance | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Other: Investigative bone study in adults rats: 13-weeks | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 100, 400 | Yes | 1270139 | 4.2.3.7.3-3 |
| Other: Repeated dose toxicity; 13 week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 2000/1000 | Yes | 0670079 | 4.2.3.7.7-1 |
| Other: Repeated dose toxicity; 13 week | Mouse | CD-1 | Oral (gavage) | 0, 1000 | Yes | 0670080 | 4.2.3.7.7-2 |
| Other: Repeated dose toxicity; 13 week | Mouse | B6C3F1 | Oral (gavage) | 0, 1000/750 | Yes | 0670081 | 4.2.3.7.7-3 |

## 2.6.7.2 C　トキシコキネティクス: トキシコキネティクス試験一覧表（valsartan）

| Study type | Species | Strain | Method of administration | Doses (mg/kg) | GLP compliance | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reproductive and developmental toxicity: juvenile toxicity | Rat | Han Wistar | Oral (gavage) | 0, 1, 20, 150 | Yes | 0680270 | 4.2.3.5.4-5 |

## 2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績一覧表

## 2.6.7.3 A トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696）

**AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]**

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 3 | | | | | 52.9 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 6.7 | | | | | | | | 6506[a] | CLCZ696A2117 and CLCZ696B2223 | 5.3.5.3-10 |
| 10 | | | NC | NC | | | | | 0670468 | 4.2.3.2-4 |
| 10 | | | NC | NC | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 10 | | | NC | NC | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 10 | | | | | 303 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 25 | | | | | | 6440* | 3710* | | 0670259 | 4.2.3.2-7 |
| 30 | | | 56.3 | 48.6 | | | | | 0670468 | 4.2.3.2-4 |
| 30 | | | NC | NC | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 30 | | | | NC p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 30 | | | 15.3 | 74.4 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 30 | | | | | 878 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 30 | | | | | | 5990 | 5760 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 30 | | | | | | 2640 | 2000 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |

## 2.6.7.3 A トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696，続き）

### AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 50 | 18.1 | 100 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 50 | 67.9 | 388 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 50 | | | 811 | 594 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 50 | | | | | | 7950 | 15000 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 50 | | | | | | | 21500 | | 1270586 | 4.2.3.7.3-1-1 |
| 100 | | | 345 | 291 | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 100 | 223 | 462 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 100 | | | 253 | 239 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 100 | | | | 509 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 100 | | | | | | 27500* | 31000* | | 0670259 | 4.2.3.2-7 |
| 100 | | | | | | 38300 | 50100 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 100 | | | | | | 24600 | 34500 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 100 | | | | | | 20800 | 20100 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 200 | 964 | 2930 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 200 | 224 | 3630 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 200 | | | 1410 | 1910 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 200 | | | | 821 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 200 (subcutaneous) | | | 4470 | | | | | | 0670623 | 4.2.3.6-1 |
| 300 | | | | | | 258000 | 181000 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 300 | | | | | | 147000 | 154000 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 300 | | | | | | 93400 | 111000 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 400 | 9080 | 2200 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 400 | 1050 | 14500 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |

## 2.6.7.3 A トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696，続き）

### AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 600 | | | | | | 778000 | 269000 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 600 | | | 5600 | 4720 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 800 | 69000 | 145000 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 1200 | | | 9450 | 12200 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |

All studies by the oral route of administration with the exception of study 0670623 (subcutaneous). All data from end of dosing unless noted otherwise.

* = AUC from Day 1

NC = Not calculated

a = Pooled data from study CLCZ696A2117 and study LCZ696B2223 in heart failure patients. AUC0-12h: ×2 after multiple dosing of LCZ696 200 mg BID to heart failure patients; assumes a mean body weight of 60 kg.

p = pregnant animal

## 2.6.7.3 B　トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696）

### LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 3 | | | | | 1930 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 6.7 | | | | | | | | 303222[a] | CLCZ696A 2117 and CLCZ696B 2223 | 5.3.5.3-10 |
| 10 | | | 2350 | 2490 | | | | | 0670468 | 4.2.3.2-4 |
| 10 | | | 2110 | 1470 | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 10 | | | 1620 | 1730 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 10 | | | | | 8920 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 25 | | | | | | 31700* | 29800* | | 0670259 | 4.2.3.2-7 |
| 30 | | | 6310 | 5420 | | | | | 0670468 | 4.2.3.2-4 |
| 30 | | | 5160 | 4800 | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 30 | | | | 5950 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 30 | | | 3620 | 6720 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 30 | | | | | 102000 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 30 | | | | | | 37800 | 34000 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 30 | | | | | | 30300 | 24100 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 50 | 1330 | 1660 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 50 | 1560 | 54500 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 50 | | | 6070 | 10500 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 50 | | | | | | 70000 | 88800 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 50 | | | | | | | 83200 | | 1270586 | 4.2.3.7.3-1-1 |

## 2.6.7.3 B　　トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696，続き）

### LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 100 | 4170 | 12100 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 100 | | | 36300 | 19300 | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 100 | | | 14700 | 15700 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 100 | | | | 19200 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 100 | | | | | | 180000* | 147000* | | 0670259 | 4.2.3.2-7 |
| 100 | | | | | | 233000 | 284000 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 100 | | | | | | 176000 | 146000 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 100 | | | | | | 148000 | 156000 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 200 | 22300 | 38400 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 200 | 8660 | 363000 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 200 | | | 41100 | 54400 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 200 | | | | 29400 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 200 (subcutaneous) | | | 59300 | | | | | | 0670623 | 4.2.3.6-1 |
| 300 | | | | | | 748000 | 894000 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 300 | | | | | | 659000 | 569000 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 300 | | | | | | 1100000 | 1220000 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 400 | 225000 | 160000 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 400 | 56100 | 78300 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 600 | | | 112000 | 193000 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 600 | | | | | | 4010000 | 2990000 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 800 | 3780000 | 2160000 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |

## 2.6.7.3 B　　トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696，続き）

### LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 1200 | | | 315000 | 222000 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |

All studies by the oral route of administration with the exception of study 0670623 (subcutaneous). All data from end of dosing unless noted otherwise.

* = AUC from Day 1

a = Pooled data from study CLCZ696A2117 and study LCZ696B2223 in heart failure patients. AUC0-12h ×2 after multiple dosing of LCZ696 200 mg BID to heart failure patients; assumes a mean body weight of 60 kg.

p = pregnant animal

## 2.6.7.3 C　トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696）

**valsartan [AUC0-24h (ng▪h/mL)]**

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 3 | | | | | 41100 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 6.7 | | | | | | | | 82776[a] | CLCZ696A2117 and CLCZ696B2223 | 5.3.5.3-10 |
| 10 | | | 4950 | 3950 | | | | | 0670468 | 4.2.3.2-4 |
| 10 | | | 4840 | 3170 | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 10 | | | 2710 | 2240 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 10 | | | | | 169000 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 25 | | | | | | 5700* | 5300* | | 0670259 | 4.2.3.2-7 |
| 30 | | | 10700 | 11500 | | | | | 0670468 | 4.2.3.2-4 |
| 30 | | | 11500 | 10300 | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 30 | | | | 13400 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 30 | | | 8650 | 7560 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 30 | | | | | 400000 p | | | | 0670280 | 4.2.3.5.2-3 |
| 30 | | | | | | 5650 | 4920 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 30 | | | | | | 9990 | 7010 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 50 | 811 | 2440 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 50 | 684 | 2690 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 50 | | | 12100 | 20100 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 50 | | | | | | 8110 | 8980 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 50 | | | | | | | 6920 | | 1270586 | 4.2.3.7.3-1-1 |

### 2.6.7.3 C　　トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696，続き）

**valsartan [AUC0-24h (ng•h/mL)]**

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 100 | 1670 | 2800 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 100 | | | 53500 | 32600 | | | | | 0670283 | 4.2.3.2-5 |
| 100 | | | 28400 | 25900 | | | | | 0670620 | 4.2.3.2-6 |
| 100 | | | | 60000 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 100 | | | | | | 16900* | 17100* | | 0670259 | 4.2.3.2-7 |
| 100 | | | | | | 35200 | 14200 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 100 | | | | | | 20500 | 12500 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 100 | | | | | | 29100 | 46200 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 200 | 5930 | 10300 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 200 | 3620 | 14800 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 200 | | | 90100 | 74700 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 200 | | | | 119000 p | | | | | 0670390 | 4.2.3.5.2-1 |
| 200 (subcutaneous) | | | 297000 | | | | | | 0670623 | 4.2.3.6-1 |
| 300 | | | | | | 74900 | 70300 | | 0670282 | 4.2.3.2-9 |
| 300 | | | | | | 69800 | 65200 | | 0670621 | 4.2.3.2-10 |
| 300 | | | | | | 157000 | 98100 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 400 | 18300 | 20800 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |
| 400 | 7850 | 16800 | | | | | | | 0670524 | 4.2.3.2-2 |
| 600 | | | 247000 | 299000 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |
| 600 | | | | | | 488000 | 274000 | | 0670276 | 4.2.3.2-8 |
| 800 | 681000 | 740000 | | | | | | | 0670221 | 4.2.3.2-1 |

## 2.6.7.3 C　　トキシコキネティクス試験成績一覧表（LCZ696，続き）

### valsartan [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 1200 | | | 562000 | 379000 | | | | | 0670220 | 4.2.3.2-3 |

All studies by the oral route of administration with the exception of study 0670623 (subcutaneous). All data from end of dosing unless noted otherwise.

* = AUC from Day 1

a = Pooled data from study CLCZ696A2117 and study LCZ696B2223 in heart failure patients. AUC0-12h ×2 after multiple dosing of LCZ696 200 mg BID to heart failure patients; assumes a mean body weight of 60 kg.

p = pregnant animal

## 2.6.7.3 D　トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377）

### AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | Female | | | |
| 3.33 | | | | | | | | | | 6506 [a] | CLCZ696A2117 and CLCZ696B2223 | 5.3.5.3-10 |
| 5 | | | | | | 112 j | 139 j | | | | 1170514 | 4.2.3.5.4-4 |
| 10 | | | NC | NC | | | | | | | 0470084 | 4.2.3.2-15 |
| 15 | | | | | | | 843 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 25 | | | | | | | | 75200 | 36000 | | 0570307 | 4.2.3.2-21 |
| 50 | | | NC | NC | | | | | | | 0470084 | 4.2.3.2-15 |
| 50 | | | 212 | 111 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 50 | | | 294 | 301 | | | | | | | 1370484 | 4.2.3.2-19 |
| 50 | | | 124 [d] | 91.5 [d] | | | | | | | 0870373 | 4.2.3.4.1-6 |
| 50 | | | | | | | 2240 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 50 | | | | | | 1180 j | 1470 j | | | | 1170514 | 4.2.3.5.4-4 |
| 50 | | | | | | | | 155000* | 134000* | | 0370097 | 4.2.3.2-20 |
| 75 | | | | 2460 p | | | | | | | 0570301 | 4.2.3.5.2-4 |

### 2.6.7.3 D トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

**AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]**

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | Female | | | |
| 100 (feed) | 250 | 255 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 100 | | | 861 | 1140 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 100 | | | 874 j[h] | 402 j[h] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 100 | | | 21400 j[e] | 20200 j[e] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 100 | | | 1900 j[f] | 1340 j[f] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 100 | | | 751j [g] | 564 j[g] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 100 | | | | 1020 | | | | | | | 1270139 | 4.2.3.7.3-3 |
| 100 | | | | | | | | 266000 | 332000 | | 0570307 | 4.2.3.2-21 |
| 150 | 1660 [c] | 2170 [c] | | | | | | | | | 0870374 | 4.2.3.4.1-5 |
| 150 | | | 411 [d] | 598 [d] | | | | | | | 0870373 | 4.2.3.4.1-6 |
| 150 | | | 1310 | 2630 | | | | | | | 0470084 | 4.2.3.2-15 |
| 150 | | | 2310 | 3830 | | | | | | | 1370484 | 4.2.3.2-19 |
| 150 | | | | | | 4410 j | 6900 j | | | | 1170514 | 4.2.3.5.4-4 |
| 200 | 720 | 7490 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 200 | | | 2030 | 3530 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 200 | | | | | | | 16400 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 200 | | | | | | | | 556000 | 694000 | | 0570307 | 4.2.3.2-21 |
| 250 | 1150 | 4010 | | | | | | | | | 0570150 | 4.2.3.2-13 |
| 250 (feed) | 4650 | 794 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 250 | | | 7740 | 3810 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |
| 250 | | | | 56800 p | | | | | | | 0570301 | 4.2.3.5.2-4 |
| 250 | | | | | | | | 302000* | 447000* | | 0370097 | 4.2.3.2-20 |

### 2.6.7.3 D　　トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

**AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]**

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | Female | | | |
| 400 | 6390 [b] | 9840 [b] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 400 | 4940 [c] | 12800 [c] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 400 | 7200 | 19400 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 400 | 3380 | 5410 | | | | | | | | | 0770896 | 4.2.3.4.1-4 |
| 400 | 3350 [d] | 38700 [d] | | | | | | | | | 0870374 | 4.2.3.4.1-5 |
| 400 | | | 5590 | 6060 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 400 | | | 9710 | 5610 | | | | | | | 0770711 | 4.2.3.2-18 |
| 400 | | | 4590 j[h] | 5360 j[h] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 400 | | | 1510 [d] | 2110 [d] | | | | | | | 0870373 | 4.2.3.4.1-6 |
| 400 | | | 83700 j[e] | 49200 j[e] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 400 | | | 9010 j[f] | 5530 j[f] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 400 | | | 4350 j[g] | 7000 j[g] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 400 | | | | 4130 | | | | | | | 1270139 | 4.2.3.7.3-3 |
| 500 | 15500 | 29300 | | | | | | | | | 0570150 | 4.2.3.2-13 |
| 500 (feed) | 463 | 1280 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 500 | | | 8350 | 18700 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |
| 500 | | | | | | | 71300 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 500 | | | | | | | | 270000* | 647000* | | 0370097 | 4.2.3.2-20 |
| 600 | | | 11800 | 7480 | | | | | | | 1370484 | 4.2.3.2-19 |
| 750 | 88600 | 49000 | | | | | | | | | 0670081 | 4.2.3.7.7-3 |
| 750 | | | | 38000 p | | | | | | | 0570301 | 4.2.3.5.2-4 |

## 2.6.7.3 D トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

### AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice male | Mice female | Rats male | Rats female | Dogs male | Rabbits male | Rabbits female | Marmosets male | Marmosets Female | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 800 | 133000 [b] | 34200 [b] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 800 | 14400 [c] | 42500 [c] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 800 | 18800 | 117000 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 800 | 8000 | 31300 | | | | | | | | | 0770896 | 4.2.3.4.1-4 |
| 800 | | | 11900 | 24500 | | | | | | | 0770711 | 4.2.3.2-18 |
| 800 | | | 16300 j[h] | 12100 j[h] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 800 | | | 121000 j[e] | 137000 j[e] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 800 | | | 14500 j[f] | 18800 j[f] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 800 | | | 7620 j[g] | 21400 j[g] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 1000 (feed) | 2330 | 2180 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 1000 | 50600 | | | | | | | | | | 0670079 | 4.2.3.7.7-1 |
| 1000 | 44300 | | | | | | | | | | 0670080 | 4.2.3.7.7-2 |
| 1000 | | | 9100 | 26200 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |
| 1200 | 26100 [c] | 576000 [c] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 1200 | 53900 | 57100 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 1200 | 55000 | 33800 | | | | | | | | | 0770896 | 4.2.3.4.1-4 |
| 1200 | 33700 [d] | 111000 [d] | | | | | | | | | 0870374 | 4.2.3.4.1-5 |
| 1200 | | | 39500 | 24600 | | | | | | | 0770711 | 4.2.3.2-18 |
| 1500 | 121000 | 265000 | | | | | | | | | 0570150 | 4.2.3.2-13 |

### 2.6.7.3 D　　トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

### AHU377 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | Female | | | |
| 2000 (feed) | 3430 | 5220 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 2000 | | | 217000 | 17900 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |

All preclinical studies by the oral (gavage) route of administration with the exception of study 0570208, in which compound was administered in feed. All exposure data represent mean end of dosing AUC0-24h with exception of study 0370097 (day 1) and [study 1170516] (post natal days 7, 21 and 34).

* = AUC from Day 1

NC = Not calculated

a = Pooled data from study CLCZ696A2117 and study LCZ696B2223 in heart failure patients. AUC0-12h ×2 after multiple dosing of LCZ696 200 mg BID to heart failure patients; assumes a mean body weight of 60 kg.

b, c = For [study 0770781]: phosphate buffer (a) and HPC (b) vehicles were compared at 400 and 800 mg/kg doses and exposures for both vehicles are reported; the vehicle for the 1200 mg/kg dose was HPC.

d = Carcinogenicity studies utilized sparse sampling therefore Cmax (ng/mL) concentration in week 26 is presented.

e,f,g,h = For juvenile toxicity studies [study 0870734] [study 1170516], LBQ657 AUC0-24h exposures on both post natal day 7 (e), 21 (f), 34 (g) and post natal day 64 (h) are provided.

j = juvenile animal

p = pregnant animal

## 2.6.7.3 E　トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377）

### LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | female | | | |
| 3.33 | | | | | | | | | | 303222 [a] | CLCZ696A2117 and CLCZ696B2223 | 5.3.5.3-10 |
| 5 | | | | | | 3920 j | 4330 j | | | | 1170514 | 4.2.3.5.4-4 |
| 10 | | | 2560 | 2940 | | | | | | | 0470084 | 4.2.3.2-15 |
| 15 | | | | | | | 35100 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 25 | | | | | | | | 34200 | 26600 | | 0570307 | 4.2.3.2-21 |
| 50 | | | 21200* | 21500* | | | | | | | 0370107 | 4.2.3.2-14 |
| 50 | | | 27800 | 16500 | | | | | | | 0470084 | 4.2.3.2-15 |
| 50 | | | 22300 | 16800 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 50 | | | 11900 [d] | 13200 [d] | | | | | | | 0870373 | 4.2.3.4.1-6 |
| 50 | | | | | | | 129000 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 50 | | | | | | 37300 j | 41200 j | | | | 1170514 | 4.2.3.5.4-4 |
| 50 | | | | | | | | 59600* | 53400* | | 0370097 | 4.2.3.2-20 |
| 75 | | | | 60300 p | | | | | | | 0570301 | 4.2.3.5.2-4 |

### 2.6.7.3 E トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

**LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]**

| Daily dose (mg/kg) | Mice male | Mice female | Rats male | Rats female | Dogs male | Rabbits male | Rabbits female | Marmosets male | Marmosets Female | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 (feed) | 999 | 1100 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 100 | | | 73800 | 48400 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 100 | | | 435000 [e] | 309000 [e] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 100 | | | 203000 [e] | 176000 [e] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 100 | | | 182000 [f] | 117000 [f] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 100 | | | 47200 [g] | 45500 [g] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 100 | | | 46600 [h] | 37300 [h] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 100 | | | | 71200 | | | | | | | 1270139 | 4.2.3.7.3-3 |
| 100 | | | | | | | | 247000 | 193000 | | 0570307 | 4.2.3.2-21 |
| 150 | 24600 [d] | 35700 [d] | | | | | | | | | 0870374 | 4.2.3.4.1-5 |
| 150 | | | 15600 [d] | 30500 [d] | | | | | | | 0870373 | 4.2.3.4.1-6 |
| 150 | | | 82500 | 81300 | | | | | | | 0470084 | 4.2.3.2-15 |
| 150 | | | 108000 | 205000 | | | | | | | 1370484 | 4.2.3.2-19 |
| 150 | | | | | | 112000 j | 136000 j | | | | 1170514 | 4.2.3.5.4-4 |
| 200 | 36000 | 247000 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 200 | | | 164000 | 171000 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 200 | | | | | | | 679000 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 200 | | | | | | | | 401000 | 482000 | | 0570307 | 4.2.3.2-21 |
| 250 | 42300 | 66700 | | | | | | | | | 0570150 | 4.2.3.2-13 |
| 250 (feed) | 8050 | 2810 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 250 | | | 115000* | 98600* | | | | | | | 0370107 | 4.2.3.2-14 |
| 250 | | | 135000 | 70100 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |
| 250 | | | | 58700 p | | | | | | | 0570301 | 4.2.3.5.2-4 |
| 250 | | | | | | | | 173000* | 312000* | | 0370097 | 4.2.3.2-20 |

## 2.6.7.3 E トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

### LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | Female | | | |
| 400 | 99100 [b] | 93200 [b] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 400 | 100000 [c] | 411000 [c] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 400 | 102000 | 123000 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 400 | 106000 | 111000 | | | | | | | | | 0770896 | 4.2.3.4.1-4 |
| 400 | 80600 [d] | 306000 [d] | | | | | | | | | 0870374 | 4.2.3.4.1-5 |
| 400 | | | 255000 | 344000 | | | | | | | 0570207 | 4.2.3.2-17 |
| 400 | | | 266000 | 214000 | | | | | | | 0770711 | 4.2.3.2-18 |
| 400 | | | 1780000j[e] | 1990000j[e] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 400 | | | 752000 j[e] | 700000 j[e] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 400 | | | 574000 j[f] | 485000 j[f] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 400 | | | 239000 j[g] | 369000 j[g] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 400 | | | 157000 j[h] | 207000 j[h] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 400 | | | 27900 [d] | 58100 [d] | | | | | | | 0870373 | 4.2.3.4.1-6 |
| 400 | | | | 263000 | | | | | | | 1270139 | 4.2.3.7.3-3 |
| 500 | 256000 | 277000 | | | | | | | | | 0570150 | 4.2.3.2-13 |
| 500 (feed) | 5780 | 4440 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 500 | | | 132000 | 144000 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |
| 500 | | | | | | | 1730000 p | | | | 0770644 | 4.2.3.5.2-7 |
| 500 | | | | | | | | 210000* | 291000* | | 0370097 | 4.2.3.2-20 |
| 750 | 457000 | 247000 | | | | | | | | | 0670081 | 4.2.3.7.7-3 |
| 750 | | | | 659000 p | | | | | | | 0570301 | 4.2.3.5.2-4 |

## 2.6.7.3 E トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

### LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | Female | | | |
| 800 | 884000 [b] | 267000 [b] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 800 | 184000 [c] | 421000 [c] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 800 | 396000 | 1220000 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 800 | 178000 | 337000 | | | | | | | | | 0770896 | 4.2.3.4.1-4 |
| 800 | | | 3240000 [e] | 3200000 [e] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 800 | | | 1350000 j[e] | 1400000 j[e] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 800 | | | 813000 j[f] | 895000 j[f] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 800 | | | 645000 j[g] | 1090000j[g] | | | | | | | 1170516 | 4.2.3.5.4-3 |
| 800 | | | 465000 j[h] | 802000 j[h] | | | | | | | 0870734 | 4.2.3.5.4-2 |
| 800 | | | 304000 | 475000 | | | | | | | 0770711 | 4.2.3.2-18 |
| 1000 (feed) | 21000 | 8080 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 1000 | 416000 | | | | | | | | | | 0670079 | 4.2.3.7.7-1 |
| 1000 | 280000 | | | | | | | | | | 0670080 | 4.2.3.7.7-2 |
| 1000 | | | 304000* | 241000* | | | | | | | 0370107 | 4.2.3.2-14 |
| 1000 | | | 218000 | 146000 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |
| 1200 | 533000 [c] | 874000 [c] | | | | | | | | | 0770781 | 4.2.3.4.1-1 |
| 1200 | 540000 | 427000 | | | | | | | | | 0770782 | 4.2.3.4.1-2 |
| 1200 | 759000 | 510000 | | | | | | | | | 0770896 | 4.2.3.4.1-4 |
| 1200 | 264000 [d] | 380000 [d] | | | | | | | | | 0870374 | 4.2.3.4.1-5 |
| 1200 | | | 807000 | 739000 | | | | | | | 0770711 | 4.2.3.2-18 |

## 2.6.7.3 E トキシコキネティクス試験成績一覧表（AHU377，続き）

### LBQ657 [AUC0-24h (ng•h/mL)]

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | Rabbits | | Marmosets | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | male | female | male | Female | | | |
| 1500 | 2190000 | 1690000 | | | | | | | | | 0570150 | 4.2.3.2-13 |
| 2000 (feed) | 51000 | 31300 | | | | | | | | | 0570208 | 4.2.3.4.1-3 |
| 2000 | | | 683000 | 103000 | | | | | | | 0670107 | 4.2.3.2-16 |

All preclinical studies by the oral (gavage) route of administration with the exception of study 0570208, in which compound was administered in feed. All exposure data represent mean end of dosing AUC0-24h with exception of study 0370097 and study 0370107 (day 1).

* = AUC from Day 1

a = Pooled data from study CLCZ696A2117 and study LCZ696B2223 in heart failure patients. [AUC0-12h ] ×2 after multiple dosing of LCZ696 200 mg BID to heart failure patients; assumes a mean body weight of 60 kg.

b, c = For [study 0770781]: phosphate buffer (a) and HPC (b) vehicles were compared at 400 and 800 mg/kg doses and exposures for both vehicles are reported; the vehicle for the 1200 mg/kg dose was HPC.

d = Carcinogenicity studies utilized sparse sampling therefore Cmax (ng/mL) concentration in week 26 is presented.

e, f, g, h = For juvenile toxicity studies [study 0870734] [study 1170516], LBQ657 AUC0-24h exposures on both post natal day 7 (e), 21 (f), 34 (g) and post natal day 64 (h) are provided..

j = juvenile animal

p = pregnant animal

## 2.6.7.3 F　トキシコキネティクス試験成績一覧表（valsartan，幼若ラット）

**valsartan [AUC0-24h (ng▪h/mL)]**

| Daily dose (mg/kg) | Mice | | Rats | | Dogs | | Rabbits | Monkeys | | Humans | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | male | female | male | female | male | female | female | male | female | | | |
| 1 [a] | | | 16000 | 14300 | | | | | | | 0680270 | 4.2.3.5.4-5 |
| 1 [b] | | | 505 | 430 | | | | | | | 0680270 | 4.2.3.5.4-5 |
| 20 [a] | | | 268000 | 320000 | | | | | | | 0680270 | 4.2.3.5.4-5 |
| 20 [b] | | | 15000 | 14900 | | | | | | | 0680270 | 4.2.3.5.4-5 |
| 150 [a] | | | 608000 | 957000 | | | | | | | 0680270 | 4.2.3.5.4-5 |
| 150 [b] | | | 82500 | 101000 | | | | | | | 0680270 | 4.2.3.5.4-5 |

a = Postpartum day 7

b = Postpartum day 70

## 2.6.7.4 毒性試験に用いた原薬／不純物

| Batch no. | Purity (%) Val/AHU/Total | Specified impurities (HPLC) 類縁物質A* | 類縁物質B* | 類縁物質C* | 類縁物質D* | 類縁物質E* | Study number | Study type |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Assay: | Val:[redacted]% AHU:[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | | |
| 0650001 | [redacted]101.1 | NS | NS | NS | NS | NS | 0670221 | 2-week oral (gavage) toxicity study with LCZ696 in mice. |
| | | | | | | | 0670524 | 13-week oral (gavage) toxicity study with LCZ696 in mice |
| | | | | | | | 0670220 | 2-week oral (gavage) toxicity study with LCZ696 in rats |
| | | | | | | | 0670468 | 2-week oral (gavage) toxicity study with LCZ696 in rats |
| | | | | | | | 0670283 | 13-week oral (gavage) toxicity study with LCZ696 in rats with 4-week recovery |
| | | | | | | | 0670259 | 1-week oral (gavage) toxicity study with LCZ696 in cynomolgus monkeys |
| | | | | | | | 0670276 | 2-week oral toxicity study with LCZ696 in cynomolgus monkeys |
| | | | | | | | 0670282 | 13-week oral toxicity study with LCZ696 in cynomolgus monkeys with a 4-week recovery |
| | | | | | | | 0612017 | Ames study with LCZ696 |
| | | | | | | | 0670279 | Oral (gavage) embryo-fetal development dose range-finding study with LCZ696 in rabbits |
| | | | | | | | 0670623 | 3-day subcutaneous tolerability study with LCZ696 in male rats |
| | | | | | | | 0670624 | 2-week comparative oral and subcutaneous study with LCZ696 in male rats (referred to as 5 day in IND; early sacrifice on day 5) |

＊承認情報提供時に置き換えた

| Batch no. | Purity (%) Val/AHU/Total | Specified impurities (HPLC) 類縁物質A* | 類縁物質B* | 類縁物質C* | 類縁物質D* | 類縁物質E* | Study number | Study type |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Assay: | Val:[redacted]%<br>AHU:[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | ≤[redacted]% | | |
| 0651002 | [redacted]100.6 | NS | NS | NS | NS | NS | 0670621 | 39-week nasal (gavage) toxicity study with LCZ696 in cynomolgus monkeys with a 4-week recovery |
| 0651003 | [redacted]99.3 | NS | NS | NS | NS | NS | 0770051 | *In vivo* micronucleus study with LCZ696 |
| 0651004 | [redacted]99.7 | NS | NS | NS | NS | NS | 0770051 | *In vivo* micronucleus study with LCZ696 |
| | | | | | | | 0770050 | *In vitro* chromosome aberration study with LCZ696 |
| | | | | | | | 0670620 | 26-week oral (gavage) toxicity study with LCZ696 in rats with 4-week recovery |
| | | | | | | | 0670280 | Oral (gavage) embryo-fetal development study with LCZ696 in rabbits |
| | | | | | | | 0670390 | Oral (gavage) embryo-fetal development study with LCZ696 in rats |
| 0622009 | [redacted]98.9 | NS | NS | NS | NS | NS | 0670621 | 39-week nasal (gavage) toxicity study with LCZ696 in cynomolgus monkeys with a 4-week recovery |
| 0824074 | [redacted]99.9 | 0.08 | NS | NS | NS | NS | 0970613 | Oral (gavage) fertility and early embryonic development study with LCZ696 in rats |
| C0001 | [redacted]100.5 | NS | NS | NS | NS | NS | 1270586 | A 16-Day Oral (gavage) investigational study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta in the female Cynomolgus Monkey |

NS= Not specified. Impurity present at <0.05%.

＊承認情報提供時に置き換えた

## 2.6.7.5 単回投与毒性試験

## 2.6.7.5 A 単回投与毒性試験

該当資料なし

## 2.6.7.5 B 単回投与毒性試験

| Species/ strain | Method of administration: (vehicle/ formulation) | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | Observed maximum non-lethal dose (mg/kg) | Observed minimum lethal dose (mg/kg) | Noteworthy findings: | GLP compliance | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/ CD-1 | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | 0, 50, 250, 1000, 2000 | M: 3, F: 3; M: 5, F: 5 (2000) | 2000 | Not determined | No compound-related clinical signs, body changes or gross macroscopic changes. No mortality.<br>No observed effect level: 2000 mg/kg | Yes | [0480024] | 4.2.3.1-1 |
| Mouse/ CD-1 | Intraperitoneal; 0.5% CMC, suspensions | 0, 25, 50, 300, 500 | M: 3, F: 3; M: 5, F: 5 (500) | 500 | Not determined | 500 mg/kg: Minimal clinical signs (decreased activity, abnormal gait and stance).<br>No mortality.<br>No observed effect level: 300 mg/kg | Yes | [0480022] | 4.2.3.1-2 |
| Rat/ Han Wistar | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | 0, 50, 250, 1000, 2000 | M: 3, F: 3; M: 5, F: 5 (2000) | 2000 | Not determined | No compound-related clinical signs, body changes or gross macroscopic changes. No mortality.<br>No observed effect level: 2000 mg/kg | Yes | [0480025] | 4.2.3.1-3 |
| Rat/ Han Wistar | Intraperitoneal; 0.5% CMC, suspensions | 0, 25, 50, 300, 500 | M: 3, F: 3; M: 5, F: 5 (500) | 500 | Not determined | ≥25 mg/kg: Minimal clinical signs (piloerection at ≥25 mg/kg, decreased body tone at ≥50 mg/kg, decreased activity, abnormal gait and stance at 500 mg/kg)<br>≥25 mg/kg: macroscopic changes (liver edema at ≥25 mg/kg; white lesions in spleen and/or liver / firm liver at ≥50 mg/kg).<br>No mortality.<br>No observed effect level: Not identified | Yes | [0480023] | 4.2.3.1-4 |

CMC = sodium carboxy methylcellulose

## 2.6.7.6 反復投与毒性試験

## 2.6.7.6 A 反復投与毒性試験

### Non-pivotal studies (LCZ696)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg/day) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/ CD-1 | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | At least 2 weeks | 0, 50, 200, 400, 800 | M:5, F:5 | 50 | 800 mg/kg: mortality/moribundity (M), ↓body weight gain (F), ↑reticulocytes (F), ↓heart weight<br>≥400 mg/kg: ↑BUN<br>≥200 mg/kg: stomach: mixed inflammation | [0670221] | 4.2.3.2-1 |
| Rat/ Han Wistar | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | 2-week | 0, 50, 200, 600, 1200 | M:10, F:10 | <50 | 1200 mg/kg: ↓organ weights (liver, ovarian, uterine, pituitary), gaseous dilatation of jejunum and cecum<br>≥600 mg/kg: Mortality/ moribundity, clinical signs, ↓food consumption, reduction in caliber of retinal vessels<br>≥200 mg/kg: ↓red blood cell parameters (RBC count, hemoglobin, hematocrit), ↑serum urea and Mg, ↓heart weights, kidney: juxtaglomerular hypertrophy/hyperplasia,<br>≥50 mg/kg: ↓body weight gains, stomach: mixed cell inflammation, mucosal erosion | [0670220] | 4.2.3.2-3 |
| Rat/ Han Wistar | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | 2-week | 0, 10, 30 | M:10, F:10 | 30 | No noteworthy findings | [0670468] | 4.2.3.2-4 |
| Cynomolgus monkey *(macaca fascicularis)* | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | 1-week | 0, 25, 100 | M:3, F:3 | 100 | No noteworthy findings | [0670259] | 4.2.3.2-7 |

## 2.6.7.6 A 反復投与毒性試験（続き）

### Non-pivotal studies (LCZ696)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg/day) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cynomolgus monkey *(macaca fascicularis)* | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | At least 2 weeks | 0, 50, 100, 300, 600 | M:1, F:1 (0~300 mg/kg) M:2, F:2 (600 mg/kg) | 300 (M), 100 (F) | 600 mg/kg: mucoid feces, cold to touch, pale and thin appearance, body weight loss (M), ↓food consumption, ↓reticulocytes, ↑BUN, creatinine; kidney: tubular changes, juxtaglomerular hypertrophy ≥300 mg/kg: fecal changes (soft feces and/or diarrhea) and emesis (with or without feed), body weight loss (F) | [0670276] | 4.2.3.2-8 |

a = no observed adverse-effect level; CMC = sodium carboxymethylcellulose

## 2.6.7.6 B　反復投与毒性試験

### Non-pivotal studies (AHU377)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/ CD-1 | Oral (gavage); 50 mM phosphate buffer, suspensions | 5 days | 1000, 1500 | M: 10 | 1000 | 1500 mg/kg: Mortality, clinical signs (labored breathing, distended abdomen, perineal staining, decreased stool, cold to touch, decreased activity, ocular discharge), macroscopic findings (distended stomachs, cecum and lungs). | [0670138] | 4.2.3.2-11 |
| Mouse/ B6C3F1 | Oral (gavage); 50 mM phosphate buffer, suspensions | 1-week | 500, 750 | M: 5, F: 5 | 750 | No noteworthy findings | [0670159] | 4.2.3.2-12 |
| Mouse/ CD-1 | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | Days 1-3, 5-7, 9-11 (dose escalation phase), At least 2 weeks (consecutive dose phase) | 250, 500, 1000 (dose escalation phase), 0, 250, 500, 1500 (consecutive dose phase) | M: 2, F: 2 (escalation phase), M:15, F: 15 (consecutive dose phase) | 250 (M), <250 (F) | Dose escalation phase: No adverse toxicity<br>Consecutive dose phase:<br>≥250 mg/kg: Minimal increase in the aminotransferase activities (ALT, AST; females)<br>≥500 mg/kg: Mild hematologic changes (decline in the erythron due to ↓RBC count, ↓hemoglobin, hematocrit)<br>1500 mg/kg/day[b]. Mortality in 1F. Increase in mean corpuscular volume, reticulocyte counts, spleen weights/ splenic hematopoiesis | [0570150] | 4.2.3.2-13 |

## 2.6.7.6 B 反復投与毒性試験（続き）

### Non-pivotal studies (AHU377)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg/day) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat/ Han Wistar | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | 1 week | 0, 50, 250, 1000 | M: 5, F: 5 | <50 | 1000 mg/kg: Mortality (moribund sacrifice in 1M); stomach: erosion (glandular), hyperkeratosis (non-glandular), thymus: lymphoid depletion<br>≥250 mg/kg: clinical signs (stained fur); increased thymus weight<br>≥50 mg/kg: microscopic changes in stomach (hyperplasia/hyperkeratosis of nonglandular epithelium; vacuolation and edema at higher doses) and thymus (apoptosis and lymphoid depletion; cortex) | [0370107] | 4.2.3.2-14 |
| Rat/ Han Wistar | Oral (gavage); 0.5% CMC, suspensions | At least 2 weeks | 0, 10, 50, 150 | M: 10, F: 10 | 150 | No noteworthy findings | [0470084] | 4.2.3.2-15 |

## 2.6.7.6 B 反復投与毒性試験（続き）

### Non-pivotal studies (AHU377)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg/day) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat/ Han Wistar | Oral (gavage); 50 mM phosphate buffer, suspensions | At least 2 weeks | 0, 250, 500, 1000, 2000 | M: 10; F: 10 | 250 mg/kg | Compound-related mortality in 2 females at 1000 mg/kg/day, and 1 female and 2 males at 2000 mg/kg/day. The cause of death was considered to be respiratory complications or respiratory insufficiency due to GI distention.<br>≥500 mg/kg: staining fur/peritoneal<br>≥1000 mg/kg: slightly decreased locomotor activity, chromorhinorrhea, reduced feces, salivation, labored respiration, rales and gasping; body weight loss, ↓food consumption; ↑adrenal weight, GI distention; skin/alimentary mucosal/respiratory epithelial: epidermal and epithelial apoptosis/necrosis in multiple organ systems. | [0670107] | 4.2.3.2-16 |

CMC = sodium carboxymethylcellulose; HPC = hydroxypropylcellulose

a = no observed adverse-effect level
b = not a test article-related effect but an adaptive response due to decline in the erythron

## 2.6.7.7 反復投与毒性試験

## 2.6.7.7 A 反復投与毒性試験

Report title: LCZ696: 13-Week oral (gavage) range-finding toxicity study in mice
Study no.: [0670524]
Species/strain: Mouse/Crl:CD-1 (ICR) BR
Duration of dosing: 13 Weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-2
Initial age: approximately 8 weeks (at start of dosing)
Duration of postdose: None
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: An additional 20 animals per sex per dose were assigned for toxicokinetic monitoring and were bled on day 1 (n=10) or day 75 (n=10) and then removed from the study
No Observed Adverse-Effect Level: not established

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | | 400 (Group 5) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 105 | 425 | 197 | 758 | 490 | 932 | 1560 | 6500 |
| (ng•h/mL) | Day 75 | NC | NC | 67.9 | 388 | 223 | 462 | 224 | 3630 | 1050 | 14500 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 51.7 | 115 | 81.6 | 166 | 179 | 282 | 748 | 628 |
| (ng/mL) | Day 75 | NA | NA | 58.9 | 94.1 | 86.4 | 644 | 164 | 1660 | 1330 | 14200 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 1920 | 20100 | 3860 | 38900 | 14900 | 36900 | 34100 | 295000 |
| (ng•h/mL) | Day 75 | NC | NC | 1560 | 54500 | 4170 | 12100 | 8660 | 363000 | 56100 | 78300 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 929 | 6800 | 2820 | 5870 | 9680 | 8060 | 23100 | 25500 |
| (ng/mL) | Day 75 | NA | NA | 1330 | 4440 | 1560 | 6790 | 4690 | 31100 | 52700 | 62300 |

## 2.6.7.7 A 反復投与毒性試験（続き）

Report title: 13-Week oral (gavage) range-finding toxicity study in mice Study no. 0670524

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | | 400 (Group 5) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Toxicokinetics: Valsartan | | | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 558 | 1510 | 1350 | 3840 | 3120 | 5480 | 4320 | 20600 |
| (ng•h/mL) | Day 75 | NC | NC | 684 | 2690 | 1670 | 2800 | 3620 | 14800 | 7850 | 16800 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 133 | 259 | 439 | 665 | 548 | 1630 | 1600 | 2520 |
| (ng/mL) | Day 75 | NA | NA | 338 | 535 | 454 | 2210 | 1470 | 4020 | 3120 | 7180 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | | 1[b] | 0 | 0 | 0 | 0 | 1[c] | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Body weight (% [a]) | | 42.2 g | 30.6 g | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption (% [a]) | | 6.9 g/day | 8.3 g/day | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical observations | | | | | | | | | | | |
| Aggression | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 4 | 0 |
| Excessive grooming | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | 5 | 3 |
| Hypersensitivity to touch | | 1 | 0 | 9 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Pale appearance | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Dehydration | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 6 | 0 |
| Abdominal distention | | 1 | 0 | 7 | 7 | 9 | 5 | 10 | 8 | 10 | 9 |
| Hunched posture | | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 |
| Hairloss | | 0 | 0 | 4 | 4 | 6 | 6 | 4 | 9 | 3 | 9 |
| Piloerection | | 1 | 0 | 2 | 1 | 8 | 4 | 9 | 6 | 9 | 4 |
| Locomotor activity | | | | | | | | | | | |
| Decreased (slight) | | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 6 | 1 |
| Decreased (moderate) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Increased (slight) | | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Increased (moderate) | | 0 | 0 | 1 | 2 | 7 | 5 | 6 | 8 | 10 | 9 |

## 2.6.7.7 A 反復投与毒性試験（続き）

Report title: 13-Week oral (gavage) range-finding toxicity study in mice Study no. 0670524

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | | 400 (Group 5) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Noteworthy findings: | | | | | | | | | | |
| Twitches | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 | 1 | 4 | 7 | 7 |
| Respiration | | | | | | | | | | |
| Labored | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Increased | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Ophthalmoscopy: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights [d] (%): | | | | | | | | | | |
| Heart | 0.19218 g | - | -6.75 | - | -7.54 | - | -1.69 | - | -12.88* | - |
| Kidney | - | 0.34476 g | - | +14.04** | - | +8.35 | - | +16.40** | - | +18.77** |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | | | | | | | | | | |
| Stomach | | | | | | | | | | |
| Mixed cell inflammation | | | | | | | | | | |
| Minimal | 1 | 2 | 3 | 3 | 8 | 7 | 9 | 8 | 6 | 5 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 5 |
| Distention of the glandular mucosal epithelium | | | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 3 | 8 | 2 | 4 | 2 | 8 | 7 |
| Slight | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Squamous Hyperplasia | | | | | | | | | | |
| Minimal | 2 | 4 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 6 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |

## 2.6.7.7 A 反復投与毒性試験（続き）

Report title: 13-Week oral (gavage) range-finding toxicity study in mice Study no. 0670524

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | | 400 (Group 5) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Noteworthy findings: | | | | | | | | | | |
| Histopathology (cont.): | | | | | | | | | | |
| Stomach | | | | | | | | | | |
| Hyperkeratosis | | | | | | | | | | |
| Minimal | 2 | 4 | 0 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 4 | 7 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Erosion (glandular stomach) | | | | | | | | | | |
| Slight | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 2 | - | 0 | - |
| Ulcer (Non-glandular stomach) | | | | | | | | | | |
| Slight | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 1 | - |

- = No noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable

a = At the end of dosing period. Control values are group mean absolute weights. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated.

b = Death due to gavage error

c = Accidental death

d = Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Dunnet's test)

## 2.6.7.7 B 反復投与毒性試験

Report title: LCZ696: 13-week oral (gavage) toxicity study in rats with a 4-week recovery period
Study no.: [0670283]
Species/strain: Rat/IGS Wistar Hannover
Duration of dosing: 13 Weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-5
Initial age: approximately 8 weeks (at start of dosing)
Duration of postdose:4 Weeks
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: None
No Observed Adverse-Effect Level: 30 mg/kg

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 10 (Group 2) | | 30 (Group 3) | | 100 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 16 | F: 16 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 16 | F: 16 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 363 | 351 |
| (ng•h/mL) | Day 76 | NC | NC | NC | NC | NC | NC | 345 | 291 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 16.5 | 16.7 | 41.7 | 38.2 | 239 | 143 |
| (ng/mL) | Day 76 | NA | NA | 10.0 | 15.9 | 19.0 | 11.9 | 219 | 126 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 2670 | 1830 | 6290 | 4490 | 22800 | 23600 |
| (ng•h/mL) | Day 76 | NC | NC | 2110 | 1470 | 5160 | 4800 | 36300 | 19300 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 1130 | 1330 | 2840 | 1430 | 9710 | 4670 |
| (ng/mL) | Day 76 | NA | NA | 1650 | 1480 | 1900 | 1520 | 12800 | 5740 |
| Toxicokinetics: Valsartan | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 6210 | 3950 | 17000 | 12600 | 47800 | 46600 |
| (ng•h/mL) | Day 76 | NC | NC | 4840 | 3170 | 11500 | 10300 | 53500 | 32600 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 1690 | 1820 | 3440 | 2030 | 12300 | 9080 |
| (ng/mL) | Day 76 | NA | NA | 1990 | 1290 | 3440 | 1900 | 8660 | 5640 |

## 2.6.7.7 B 反復投与毒性試験（続き）

Report title: LCZ696: 13-week oral (gavage) toxicity study in rats with a 4-week recovery period Study no. 0670283

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 10 (Group 2) | | 30 (Group 3) | | 100 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 16 | F: 16 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 16 | F: 16 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body weight (%)[a] | 430.8 g | 244.3 g | -3.62 | -0.49 | -3.88 | -1.23 | -8.17* | -5.61 |
| Body weight gain (%)[a] | 187.6 g | 74.2 g | -10.02 | -4.31 | -8.58 | -9.30 | -18.76** | -21.43* |
| Food consumption (%)[a] | 19.1 g | 13.6 g | -2.09 | -0.74 | -3.14 | 1.47 | -9.95* | -5.88 |
| Clinical observations | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights (%):[b] | | | | | | | | |
| Heart | 1.16 g | 0.76619 g | -1.99 | -4.20 | -10.16 | -7.40 | -19.28## | -17.23** |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Stomach-mixed inflammatory cell infiltrates | | | | | | | | |
| Minimal | 5 | 5 | 6 | 4 | 6 | 4 | 8 | 8 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Additional examinations: | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |

## 2.6.7.7 B　反復投与毒性試験（続き）

Report title: LCZ696: 13-week oral (gavage) toxicity study in rats with a 4-week recovery period　Study no. 0670283

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 10 (Group 2) | | 30 (Group 3) | | 100 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 16 | F: 16 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 16 | F: 16 |
| **Postdose evaluation:** | | | | | | | | |
| Number evaluated | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Body weight (%)[c] | 464.1 g | 247.7 g | NA | NA | NA | NA | -10.60* | -1.98 |

- = No noteworthy findings; NA = Not applicable; NC = Not calculated

a = At the end of dosing period. Control values are group mean absolute values. Treated group values are the % change from control values in the direction indicated. Mean values include animals from the recovery group. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

b = Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

c = At the end of the recovery period. Control values are group mean absolute weights. Treated group values are the % change from control absolute means in the direction indicated. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Dunnett's test); ## $p<0.01$ (Dunn's test)

## 2.6.7.7 C　反復投与毒性試験

Report title: LCZ696: 26-week oral (gavage) toxicity study in rats with a 4-week recovery period
Study no.: [0670620]
Species/strain: Rat/Crl: WI(Glx/BRL/Han)IGS BR
Duration of dosing: 26 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-6
Initial age: approximately 8 weeks (at start of dosing)
Duration of postdose: at least 4 weeks
GLP compliance: yes
Date of first dose [redacted]
Method of administration: oral (gavage)
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: none
No Observed Adverse-Effect Level: 30 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg/day base) | | 0 (Control – Group 1) | | 10 (Group 2) | | 30 (Group 3) | | 100 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 30 | F: 30 | M: 20 | F: 20 | M: 20 | F: 20 | M: 30 | F: 30 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 18.8 | 12.4 | 29.9 | NA | 374 | 184 |
| (ng•h/mL) | Day 150 | NC | NC | NC | NC | 15.3 | 74.4 | 253 | 239 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 15.4 | 10.8 | 28.6 | 41.2 | 202 | 128 |
| (ng/mL) | Day 150 | NA | NA | 7.70 | 7.25 | 12.6 | 61.7 | 87.2 | 206 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 1630 | 1170 | 5300 | 3410 | 24700 | 11200 |
| (ng•h/mL) | Day 150 | NC | NC | 1620 | 1730 | 3620 | 6720 | 14700 | 15700 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 1190 | 1160 | 1770 | 3540 | 9400 | 4250 |
| (ng/mL) | Day 150 | NA | NA | 1360 | 1830 | 1600 | 4140 | 4930 | 10600 |
| Toxicokinetics: Valsartan | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 3210 | 2710 | 12400 | 6220 | 47200 | 31200 |
| (ng•h/mL) | Day 150 | NC | NC | 2710 | 2240 | 8650 | 7560 | 28400 | 25900 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 1250 | 1430 | 2610 | 4210 | 9600 | 6250 |
| (ng/mL) | Day 150 | NA | NA | 1110 | 1440 | 1240 | 3080 | 4660 | 5060 |

## 2.6.7.7 C　反復投与毒性試験（続き）

Report title: LCZ696: 26-week oral (gavage) toxicity study in rats with a 4-week recovery period　Study no.: 0670620

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 10 (Group 2) | | 30 (Group 3) | | 100 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 30 | F: 30 | M: 20 | F: 20 | M: 20 | F: 20 | M: 30 | F: 30 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | 1[b] | 3[c, c, d] | 1[e] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body weight mean (%[a]) | 501.4 g | - | -2.9 | - | -3.9 | - | -8.1** | - |
| Body weight gain mean (%[a]) | 266.6 g | 106.1 g | -6.1 | -4.4 | -8.3[$] | -8.4 | -16.1[$$] | -8.0 |
| Food consumption | - | - | - | - | - | - | Decreased | - |
| Clinical observations | | | | | | | | |
| Hypersensitivity to touch | - | - | P | P | P | P | P | P |
| Piloerection | - | - | - | - | - | - | P | P |
| Increased locomotor activity | - | - | - | - | P | P | P | P |
| Abdominal distention | - | - | - | - | - | - | P | P |
| Hunched posture | - | - | - | - | - | - | P | P |
| Ophthalmoscopy | - | - | | | | | - | - |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights (%[a]): | | | | | | | | |
| Heart | 1.21 g | 0.84904 g | +1.04 | -5.76 | -4.78 | -8.53 | -13.54** | -12.95 |
| Gross pathology: | | | | | | | | |
| Stomach focus red | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Histopathology (number evaluated): | 20 | 21 | 19 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Stomach | | | | | | | | |
| Erosion | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 1 |
| Inflammation mixed | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 13 | 7 |

## 2.6.7.7 C　反復投与毒性試験（続き）

Report title: LCZ696: 26-week oral (gavage) toxicity study in rats with a 4-week recovery period Study no.: 0670620

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 10 (Group 2) | | 30 (Group 3) | | 100 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 30 | F: 30 | M: 20 | F: 20 | M: 20 | F: 20 | M: 30 | F: 30 |
| **Postdose evaluation:** | | | | | | | | |
| Number evaluated | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| Organ weights (%) [f]: | | | | | | | | |
| Heart | 1.30 g | - | NA | NA | NA | NA | -12.27+ | - |

- = no noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable; P = present

a = at the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). * p<0.05, ** p<0.01 (Dunnett's test); $ p<0.05, $$ p<0.01 (modified T test); ## p<0.01 (Dunn's test); + p<0.05 (student's test)

b = cause of death was undetermined; c = due to misgavage; d = sacrificed early due to injury; e = due to anesthesia-related;

f = control weights are group means, treated group number indicates percent difference from the mean control group weights.

## 2.6.7.7 D　反復投与毒性試験

Report title: LCZ696: 13-week oral (gavage) toxicity study in monkeys with a 4-week recovery period
Study no.: [0670282]
Species/strain: Cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*)
Duration of dosing: at least 13 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-9
Initial age: approximately 2 to 3.5 years (at start of dosing)
Duration of postdose: at least 4 weeks
GLP compliance: yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration Oral (gavage)
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: none
No Observed Adverse-Effect Level for males: 30 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 5 | F: 5 | M: 3 | F: 3 | M: 3 | F: 3 | M: 5 | F: 5 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 6590 | 6450 | 24500 | 40100 | 126000 | 134000 |
| (ng•h/mL) | Day 73 | NC | NC | 5990 | 5760 | 24600 | 34500 | 147000 | 154000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 3710 | 5800 | 8300 | 16000 | 42400 | 49200 |
| (ng/mL) | Day 73 | NA | NA | 4920 | 4020 | 11900 | 15500 | 96000 | 71200 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 47700 | 35800 | 189000 | 146000 | 687000 | 551000 |
| (ng•h/mL) | Day 73 | NC | NC | 37800 | 34000 | 176000 | 146000 | 748000 | 894000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 18000 | 17200 | 53900 | 40300 | 129000 | 126000 |
| (ng/mL) | Day 73 | NA | NA | 17600 | 17700 | 47400 | 48300 | 183000 | 186000 |
| Toxicokinetics: Valsartan | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 7900 | 8540 | 29200 | 15200 | 97700 | 78300 |
| (ng•h/mL) | Day 73 | NC | NC | 5650 | 4920 | 20500 | 12500 | 74900 | 70300 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 1310 | 1700 | 6250 | 3260 | 30000 | 21700 |
| (ng/mL) | Day 73 | NA | NA | 1170 | 1110 | 2990 | 3140 | 33400 | 16200 |

## 2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report title: 13-week oral (gavage) toxicity study in monkeys with a 4-week recovery period Study no. 0670282

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 5 | F: 5 | M: 3 | F: 3 | M: 3 | F: 3 | M: 5 | F: 5 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body weight (%[a]) | 2.5 kg | 2.7 kg | +12.0 | +3.7 | -4.0 | -7.4 | -12.0 | -14.8 |
| Estimated food consumption | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical observations[b] | | | | | | | | |
| Diarrhea | - | - | P | - | P | P | P | P |
| Soft feces | - | - | - | - | P | P | P | P |
| Mucoid feces | - | - | - | - | - | - | P | P |
| Emesis | - | - | - | - | - | - | P | - |
| Emesis with feed/apparent compound | - | - | P | - | P | - | P | P |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Electrocardiography | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | | | | | | | | |
| ↓ Red blood cells | - | - | - | - | - | - | - | 1[b] (Day 89) |
| ↓ Hemoglobin | - | - | - | - | - | - | - | 1[b] (Day 89) |
| ↓ Hematocrit | - | - | - | - | - | - | - | 1[b] (Day 89) |
| Clinical biochemistry: | | | | | | | | |
| ↑ Urea | - | - | - | - | - | - | - | 1[b] (Day 89) |
| ↑ Creatinine | - | - | - | - | - | - | - | 1[b] (Day 31, 89) |
| Urinalysis: | | | | | | | | |
| ↓ Specific Gravity (N/A) | - | - | - | - | - | - | - | 1[b] (Day 88) |

## 2.6.7.7 D 反復投与毒性試験（続き）

Report title: 13-week oral (gavage) toxicity study in monkeys with a 4-week recovery period Study no. 0670282

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 5 | F: 5 | M: 3 | F: 3 | M: 3 | F: 3 | M: 5 | F: 5 |
| Organ weights: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Kidney - Hypertrophy, JG Cell | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| **Additional examinations:** | | | | | | | | |
| **Postdose evaluation:** | | | | | | | | |
| Number evaluated | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Noteworthy findings: | - | - | NA | NA | NA | NA | - | - |

- = no noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable; P = present

a = at the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Recovery animals gained weight after cessation of dosing.

b = animal no. 4501

## 2.6.7.7 E　反復投与毒性試験

Report title: LCZ696: A 39-week toxicity study of LCZ696 administered by nasal gavage to Cynomolgus monkeys, with a 4-week recovery period

Study no.: [0670621]

Species/strain: Cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*)

Duration of dosing: 39 Weeks

Location in CTD: 4.2.3.2-10

Initial age: M: 2.4 to 3.4 years, F: 2.6 to 3.8 years (at start of dosing)

Duration of postdose: 4 Weeks

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]

Method of administration: Nasal gavage

Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: None

No Observed Adverse-Effect Level: 30 mg/kg

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 6 | F: 6 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 6 | F: 6 |
| Toxicokinetics: AHU377[a] | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 4650 | 3130 | 19100 | 23000 | 123000 | 121000 |
| (ng•h/mL) | Day 29 | NC | NC | 5110 | 4160 | 24500 | 28300 | 119000 | 130000 |
| | Day 272 | NC | NC | 2640 | 2000 | 20800 | 20100 | 93400 | 111000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 2310 | 1340 | 11000 | 14800 | 51800 | 46400 |
| (ng/mL) | Day 29 | NA | NA | 4470 | 1880 | 12500 | 16400 | 41500 | 56800 |
| | Day 272 | NA | NA | 1270 | 1020 | 13100 | 11700 | 36900 | 38300 |
| Toxicokinetics: LBQ657[a] | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 29300 | 26500 | 117000 | 140000 | 673000 | 551000 |
| (ng•h/mL) | Day 29 | NC | NC | 27900 | 28800 | 129000 | 135000 | 884000 | 564000 |
| | Day 272 | NC | NC | 30300 | 24100 | 148000 | 156000 | 659000 | 569000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 11400 | 7940 | 38900 | 55300 | 117000 | 102000 |
| (ng/mL) | Day 29 | NA | NA | 11200 | 13400 | 37400 | 45800 | 152000 | 129000 |
| | Day 272 | NA | NA | 8680 | 6680 | 44600 | 48500 | 141000 | 146000 |

## 2.6.7.7 E 反復投与毒性試験（続き）

Report title: A 39-week toxicity study of LCZ696 administered by nasal gavage to Cynomolgus monkeys, with a 4-week recovery period Study no. 0670621

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | | M: 6 | F: 6 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 6 | F: 6 |
| Toxicokinetics: Valsartan[a] | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 4970 | 4820 | 13900 | 15600 | 84900 | 77100 |
| (ng•h/mL) | Day 29 | NC | NC | 3740 | 4330 | 16900 | 15500 | 83800 | 64500 |
| | Day 272 | NC | NC | 9990 | 7010 | 29100 | 46200 | 69800 | 65200 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 781 | 1450 | 4980 | 5580 | 34000 | 28100 |
| (ng/mL) | Day 29 | NA | NA | 1070 | 1280 | 3410 | 3710 | 18700 | 16400 |
| | Day 272 | NA | NA | 813 | 825 | 2900 | 4270 | 9330 | 10600 |
| **Noteworthy findings:** | | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | | 0 | 1[b] | 0 | 0 | 0 | 0 | 1[c] | 0 |
| Body weight | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical observations | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Electrocardiography | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology:[c] | | | | | | | | | |
| RBC count ($10^6$/µL) | | | | | | | | | |
| Day 91 | | 5.837 | 5.775 | 5.580 | 5.443 | 5.473 | 5.553 | 5.444 | 5.207 |
| Day 267 | | 6.015 | 5.782 | 5.805 | 5.440 | 5.600 | 5.435 | 5.460* | 5.098 |
| Hemoglobin (g/dL) | | | | | | | | | |
| Day 91 | | 14.60 | 14.37 | 13.78* | 13.65 | 13.73* | 13.85 | 13.48* | 13.12 |
| Day 267 | | 14.63 | 14.10 | 14.13 | 13.35 | 14.00 | 12.93 | 13.42* | 12.50 |
| Hematocrit (%) | | | | | | | | | |
| Day 91 | | 44.78 | 42.67 | 42.15 | 41.10 | 42.90 | 41.48 | 40.86* | 39.67 |
| Day 267 | | 47.10 | 44.02 | 45.48 | 42.28 | 44.30 | 40.88 | 42.64* | 39.68 |

## 2.6.7.7 E　反復投与毒性試験（続き）

Report title: A 39-week toxicity study of LCZ696 administered by nasal gavage to Cynomolgus monkeys, with a 4-week recovery period　Study no. 0670621

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 6 | F: 6 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 6 | F: 6 |
| Reticulocyte counts ($10^5/\mu L$) | | | | | | | | |
| Day 22 | 0.56 | 0.55 | 0.61 | 0.66 | 0.59 | 0.62 | 0.51 | 0.40 |
| Day 91 | 0.56 | 0.45 | 0.45 | 0.70 | 0.66 | 0.52 | 0.52 | 0.42 |
| Day 267 | 0.67 | 0.65 | 0.66 | 0.73 | 0.60 | 0.64 | 0.58 | 0.49 |
| Clinical biochemistry | | | | | | | | |
| BUN (mg/dL) | | | | | | | | |
| Day 91 | 26.0 | 25.0 | 28.5 | 24.3 | 24.8 | 25.0 | 29.0 | 43.3 |
| Day 267 | 24.0 | 25.2 | 26.5 | 24.0 | 23.0 | 25.3 | 35.4* | 51.7 |
| Creatinine (mg/dL) | | | | | | | | |
| Day 91 | 0.67 | 0.72 | 0.75 | 0.68 | 0.78 | 0.70 | 0.72 | 0.77 |
| Day 267 | 0.70 | 0.76 | 0.83 | 0.70 | 0.85 | 0.73 | 0.78 | 0.88 |
| Urinalysis: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Juxtaglomerular cell hypertrophy/hyperplasia; diffuse | | | | | | | | |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Moderate | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| Juxtaglomerular cell hypertrophy/hyperplasia; multifocal | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

## 2.6.7.7 E　反復投与毒性試験（続き）

Report title: A 39-week toxicity study of LCZ696 administered by nasal gavage to Cynomolgus monkeys, with a 4-week recovery period　Study no. 0670621

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 6 | F: 6 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 6 | F: 6 |
| **Additional examinations:** | | | | | | | | |
| Coagulation | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Investigative histopathology (brain) | | | | | | | | |
| Number evaluated | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 |
| Hematoxylin and Eosin | - | - | NA | NA | NA | NA | - | - |
| Beta Amyloid 1-42 (IHC) | - | - | NA | NA | NA | NA | - | - |
| Bielschowsky's Silver [d] | - | - | NA | NA | NA | NA | - | - |
| **Postdose evaluation:** | | | | | | | | |
| Number evaluated | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| **Noteworthy findings:** | | | | | | | | |
| Clinical biochemistry (day 302): | | | | | | | | |
| BUN (mg/dL) | 26.0 | 28.0 | NA | NA | NA | NA | 29.5 | 32.5 |
| Creatinine (mg/dL) | 0.80 | 0.75 | NA | NA | NA | NA | 0.85 | 0.85 |
| Histopathology (day 303): | | | | | | | | |
| Juxtaglomerular cell hypertrophy/hyperplasia; diffuse | | | | | | | | |
| Mild | 0 | 0 | NA | NA | NA | NA | 0 | 1 |

## 2.6.7.7 E　反復投与毒性試験（続き）

Report title: A 39-week toxicity study of LCZ696 administered by nasal gavage to Cynomolgus monkeys, with a 4-week recovery period　Study no. 0670621

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 30 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 300 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 6 | F: 6 | M: 4 | F: 4 | M: 4 | F: 4 | M: 6 | F: 6 |
| Juxtaglomerular cell hypertrophy/hyperplasia; multifocal | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | NA | NA | NA | NA | 2 | 0 |
| Mild | 0 | 0 | NA | NA | NA | NA | 0 | 1 |

- = No noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable; RBC = Red blood cell; IHC = immunohistochemistry

a = Toxicokinetic analysis for 300 mg/kg dose group on Days 29 and 272 included animals from the recovery group. Results are presented as group mean values.

b = The cause of death was diagnosed as thrombocytopenia. The death was not related to LCZ696.

c = due to gavage error

d = Selected sections from Animal Nos. 1002, 4001 and 4501 only

* $p \leq 0.05$ (ANOVA with Dunnett's/Dunn's test)

## 2.6.7.7 F　反復投与毒性試験

Report title: AHU377: 13-week oral (gavage) toxicity study in rats
Study no.: [0570207]
Species/strain: Rat / Crl: WI (Glx/BRL/Han) IGS BR
Duration of dosing: At least 13 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-17
Initial age: approximately 8 weeks (at start of dosing)
Duration of postdose: None
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: None
No Observed Adverse-Effect Level: 400 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | | 400 (Group 5) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 308 | 164 | 1250 | 1410 | 2400 | 2630 | 5430 | 6360 |
| (ng•h/mL) | Day 76 | NC | NC | 212 | 111 | 861 | 1140 | 2030 | 3530 | 5590 | 6060 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 104 | 109 | 172 | 301 | 329 | 698 | 1760 | 1980 |
| (ng/mL) | Day 76 | NA | NA | 107 | 123 | 159 | 256 | 300 | 875 | 2860 | 1800 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 23500 | 16000 | 67600 | 41100 | 106000 | 98900 | 173000 | 135000 |
| (ng•h/mL) | Day 76 | NC | NC | 22300 | 16800 | 73800 | 48400 | 164000 | 171000 | 255000 | 344000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 6790 | 5420 | 10200 | 8250 | 9510 | 16900 | 41300 | 37200 |
| (ng/mL) | Day 76 | NA | NA | 8300 | 5660 | 16300 | 10200 | 23200 | 29700 | 86300 | 71300 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | | 1[a] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1[a] |
| Body weight: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption: | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical observations | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

## 2.6.7.7 F　反復投与毒性試験（続き）

Report title: AHU377: 13-week oral (gavage) toxicity study in rats Study no. 0570207

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | | 400 (Group 5) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| **Noteworthy findings:** | | | | | | | | | | |
| Hematology (day 30): | | | | | | | | | | |
| ↑ Neutrophil Count (K/uL) | 0.80 | - | 0.81 | - | 0.96 | - | 1.06$^{\$\$}$ | - | 1.27$^{\$\$}$ | - |
| Clinical biochemistry: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights (%) [b]: | | | | | | | | | | |
| Thyroid Gland | 0.02923 g | 0.02111 g | +6.35 | -8.67 | -4.60 | -21.27$^{\#}$ | +1.46 | -24.82$^{\#}$ | -20.36* | -20.00 |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = no noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable

a = accidental death, not related with AHU377

b = Both absolute and relative weights (g) differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

* $p<0.05$ (Dunnett's test); # $p<0.05$ (Dunn's test); $$ $p<0.01$ (modified T test)

## 2.6.7.7 G　反復投与毒性試験

Report title: AHU377: 4-week (interim necropsy) and 13-week oral (gavage) dose range-finding toxicity study in rats with a 4-week recovery　Study no.: [0770711]

Species/strain: Rats / Crl: WI(Han)　Duration of dosing: 4 or 13 weeks　Location in CTD: 4.2.3.2-18

Initial age: approximately 8 weeks (at start of dosing)　Duration of postdose: 4 weeks　GLP compliance: yes

Date of first dose [redacted]　Method of administration: Oral (gavage)　Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution/ suspensions

Special features: 6/sex/group (4 week segment) + 16/sex/group (13-week segment, including 6/sex/group for recovery)

Maximum tolerated dose (MTD): 800 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 400 (Group 2) | | 800 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M:6 + 16 | F: 6 + 16 |
| Toxicokinetics: | | | | | | | | | |
| 4-week segment: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 5370 | 4810 | 10900 | 15100 | 10400 | 5050 |
| (ng•h/mL) | Day 27 | NC | NC | 2330 | 4010 | 13800 | 8810 | 35100 | 27800 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 380 | 872 | 1960 | 1120 | 1880 | 590 |
| (ng/mL) | Day 27 | NA | NA | 936 | 1500 | 4660 | 3090 | 4300 | 3640 |
| 4-week segment: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 186000 | 150000 | 379000 | 344000 | 292000 | 104000 |
| (ng•h/mL) | Day 27 | NC | NC | 113000 | 166000 | 401000 | 250000 | 1110000 | 916000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 19300 | 20500 | 27300 | 24000 | 22500 | 15900 |
| (ng/mL) | Day 27 | NA | NA | 54100 | 34900 | 64000 | 56300 | 84100 | 98600 |
| 13-week segment: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 6310 | 4220 | 9570 | 7260 | 13100 | 10500 |
| (ng•h/mL) | Day 72 | NC | NC | 9710 | 5610 | 11900 | 24500 | 39500 | 24600 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 597 | 377 | 804 | 1260 | 1680 | 1440 |
| (ng/mL) | Day 72 | NA | NA | 2370 | 1850 | 2510 | 3320 | 4350 | 2390 |

## 2.6.7.7 G 反復投与毒性試験（続き）

Report title:AHU377:4-week interim necropsy) and 13-week oral (gavage) dose range-finding toxicity study in rats with a 4-week recovery Study no.: 0770711

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 400 (Group 2) | | 800 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M:6 + 16 | F: 6 + 16 |
| 13-week segment: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 170000 | 132000 | 246000 | 161000 | 422000 | 356000 |
| (ng•h/mL) | Day 72 | NC | NC | 266000 | 214000 | 304000 | 475000 | 807000 | 739000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 20300 | 10800 | 26100 | 26600 | 33800 | 26900 |
| (ng/mL) | Day 72 | NA | NA | 53900 | 74500 | 46800 | 71200 | 78700 | 115000 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4-week segment | | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3[b] |
| 13-week segment | | | | | | | | | |
| Body weight (%[a]) | | 327.8 g | 212.4 g | +3.3 | -1.2 | -0.9 | -2.6 | -0.5 | +2.9 |
| 4-week segment | | | | | | | | | |
| Body weight (%[a]) | | 439.3 g | 251.0 g | -7.7[$] | -2.0 | -8.3[$] | ±0 | -12.3[$$] | -1.0 |
| 13-week segment | | | | | | | | | |
| Food consumption (%[a]) | | 20.1 g/day | 16.1 g/day | +7.0 | -3.1 | +1.5 | -7.5 | -3.5 | -1.9 |
| 4-week segment | | | | | | | | | |
| Food consumption (%[a]) | | 20.3 g/day | 14.4 g/day | -3.9 | +0.7 | -8.9* | -1.4 | -12.8** | -4.2 |
| 13-week segment | | | | | | | | | |
| Clinical observations | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4-week segment | | | | | | | | | |

## 2.6.7.7 G 反復投与毒性試験（続き）

Report title:AHU377:4-week interim necropsy) and 13-week oral (gavage) dose range-finding toxicity study in rats with a 4-week recovery Study no.: 0770711

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 400 (Group 2) | | 800 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M:6 + 16 | F: 6 + 16 |
| Clinical observations | | | | | | | | |
| 13 week segment | | | | | | | | |
| Hunched posture, unkempt coat, decreased locomotor activity, piloerection of fur | - | - | - | - | P | - | P | - |
| Red oral stains around mouth | - | - | - | - | - | - | P | - |
| Abdominal distension, hunched posture, piloerection of fur | - | - | - | - | - | P | - | P |
| Decreased locomotor activity, perineal stains | - | - | - | - | - | - | - | P |
| Ophthalmoscopy | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4-week segment: | | | | | | | | |
| Clinical biochemistry | | | | | | | | |
| 13-wee segment: | | | | | | | | |
| ALT (U/L) | 41 | 34 | 52$ | 46$$ | 66$$ | 55$$ | 78$$ | 66$$ |
| Organ weights (%[a]): | | | | | | | | |
| 4-wk segment - Heart | 1.02 g | - | -6.67 | - | -11.0 | - | -12.0 | - |
| 13-wk segment - Heart | 1.16 g | - | -5.37 | - | -12.02* | - | -11.76* | - |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |

## 2.6.7.7 G　反復投与毒性試験（続き）

Report title:AHU377:4-week interim necropsy) and 13-week oral (gavage) dose range-finding toxicity study in rats with a 4-week recovery　Study no.: 0770711

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 400 (Group 2) | | 800 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M: 6 + 16 | F: 6 + 16 | M:6 + 16 | F: 6 + 16 |
| **Postdose evaluation:** | | | | | | | | |
| Number evaluated | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Noteworthy findings | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = no noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable; P = present
a = at the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Dunnett's test); $^{\$}$ $p<0.05$, $^{\$\$}$ $p<0.01$ (modified T-test)
b = one death possibly test article related

## 2.6.7.7 H　反復投与毒性試験

Report title: A 26-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with a 4-Week Recovery Period in the Rat
Study no.: [1370484]
Species/strain: Wistar Hannover [Crl:WI(Han)]
Duration of dosing: 26 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-19
Initial age: 8 weeks
Duration of postdose: 4 weeks
GLP compliance: yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral (gavage)
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) Hydroxypropylcellulose (Grade HF) NF, (Klucel) aqueous solution

Special features: NA
No Observed Adverse-Effect Level: 600 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 600 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 30 | F: 30 | M: 20 | F: 20 | M: 20 | F: 20 | M: 30 | F: 30 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | Day 1 | NA | NA | 309 | 215 | 543 | 3610 | 6510 | 5670 |
| | Day 23 | NA | NA | 121 | 177 | 1360 | 2660 | 12100 | 5660 |
| | Day 149 | NA | NA | 294 | 301 | 2310 | 3830 | 11800 | 7480 |
| Cmax (ng/mL) | Day 1 | NA | NA | 148 | 87 | 302 | 300 | 2330 | 1000 |
| | Day 23 | NA | NA | 120 | 246 | 514 | 372 | 2470 | 2860 |
| | Day 149 | NA | NA | 151 | 189 | 803 | 627 | 7070 | 2940 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | Day 1 | NA | NA | 25900 | 17500 | 36800 | 100000 | 167000 | 167000 |
| | Day 23 | NA | NA | 14900 | 15200 | 46800 | 86900 | 298000 | 261000 |
| | Day 149 | NA | NA | 27100 | 35900 | 108000 | 205000 | 341000 | 347000 |
| Cmax (ng/mL) | Day 1 | NA | NA | 5000 | 4860 | 12000 | 12000 | 51400 | 36200 |
| | Day 23 | NA | NA | 3530 | 8720 | 18600 | 13600 | 38800 | 92500 |
| | Day 149 | NA | NA | 6320 | 12300 | 42600 | 35500 | 48000 | 131000 |

## 2.6.7.7 H　反復投与毒性試験（続き）

Report title: A 26-Week Oral (Gavage) Toxicity Study with a 4-Week Recovery Period in the Rat　Study no.: 1370484

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 600 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 30 | F: 30 | M: 20 | F: 20 | M: 20 | F: 20 | M: 30 | F: 30 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund: | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Body weight (%[a]): | 462.2 g | - | +2.6 | - | +0.5 | - | -4.7 | - |
| Body weight gain (%[a]): | 254.8 g | - | +1.9 | - | -0.6 | - | -8.5 | - |
| Clinical observations (number of animals): | | | | | | | | |
| Salivation | - | - | - | - | 1 (1) | - | 140 (30) | 209 (30) |
| Food consumption: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Coagulation: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical chemistry: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weight: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| **Postdose evaluation:** | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = no noteworthy findings
a = at the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

## 2.6.7.7 I 反復投与毒性試験

Report title: AHU377: A 1-week oral (gavage) toxicity study in marmosets

Study no.: [0370097]

Species/strain: Marmoset (*Callithrix jacchus*)

Duration of dosing: One week

Location in CTD: 4.2.3.2-20

Initial age: approximately 2 to 4 years (at start of dosing)

Duration of postdose: None

GLP compliance: Yes (partially; the raw data and final toxicokinetic and toxicology reports for this study were audited by GLP QA)

Date of first dose: [redacted]

Method of administration: Oral gavage

Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: Blood samples for toxicokinetic analysis was obtained on the first day of dosing at the following timepoints: 1, 2, 6 and 24 hours post-dose. Each marmoset was bled twice (the first marmoset/sex/group was bled at 1 and 6 hours post-dose while the last marmoset/sex/group was bled at 2 and 24 hours post-dose).

No Observed Adverse-Effect Level: Not reported

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 250 (Group 3) | | 500 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| Toxicokinetics: AHU337 (day 1) | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | NC | NC | 155000 | 134000 | 302000 | 447000 | 270000 | 647000 |
| Cmax (ng/mL) | NA | NA | 50000 | 79100 | 153000 | 247000 | 136000 | 185000 |
| Toxicokinetics: LBQ657 (day 1) | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | NC | NC | 59600 | 66800 | 173000 | 312000 | 210000 | 291000 |
| Cmax (ng/mL) | NA | NA | 18000 | 26800 | 61700 | 60700 | 88400 | 92400 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund: | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body weight: | 472.3 g | 549.5 g | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption: | - | - | - | - | - | - | - | - |

## 2.6.7.7 I 反復投与毒性試験（続き）

Report title: AHU377: A 1-week oral (gavage) toxicity study in marmosets Study no. 0370097

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 250 (Group 3) | | 500 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| **Noteworthy findings:** | | | | | | | | |
| Clinical observations | | | | | | | | |
| Soft feces: | | | | | | | | |
| 50% soft feces | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| 75% soft feces | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 100% soft feces | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Diarrhea: | | | | | | | | |
| 25% diarrhea | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| 50% diarrhea | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| 75% diarrhea | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 |
| 100% diarrhea | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Emesis | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| Emesis with food | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry: | | | | | | | | |
| Serum albumin (g/dL) | 4.9 | 4.7 | 4.5 | 4.7 | 3.6 | 4.4 | 3.0 | 3.7 |
| Total protein (g/dL) | 7.8 | 7.8 | 7.4 | 7.6 | 5.8 | 6.8 | 5.2 | 6.1 |
| Organ weights: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |

### 2.6.7.7 I 反復投与毒性試験（続き）

Report title: AHU377: A 1-week oral (gavage) toxicity study in marmosets Study no. 0370097

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 250 (Group 3) | | 500 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 | M: 2 | F: 2 |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Stomach | | | | | | | | |
| Glandular dilatation | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| Hyperplasia of mucous neck cells | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| Eosinophilic inclusions of surface epithelium | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 1 |
| Epithelial vacuolation | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Decreased number of parietal cells | | | | | | | | |
| Minimal | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| Attenuation of surface epithelium | | | | | | | | |
| Slight | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

- = No noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable

## 2.6.7.7 J　反復投与毒性試験

Report title: AHU377: 52-week oral (gavage) toxicity study in marmosets with a 4-week recovery period
Study no.: [0570307]
Species/strain: Marmoset (*Callithrix jacchus*)
Duration of dosing: At least 52 weeks
Location in CTD: 4.2.3.2-21
Initial age: approximately 13 months to 6 years (at start of dosing)
Duration of postdose: At least 4 weeks
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

Special features: None
No Observed Adverse-Effect Level: 25 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) [b] | | 25 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 7 | F: 9 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 8 | F: 8 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 57600 | 74100 | 345000 | 294000 | 920000 | 599000 |
| (ng•h/mL) | Day 346 | NC | NC | 75200 | 36000 | 266000 | 332000 | 556000 | 694000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 29100 | 37800 | 153000 | 131000 | 270000 | 193000 |
| (ng/mL) | Day 346 | NA | NA | 40700 | 9990 | 53500 | 198000 | 236000 | 269000 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 1 | NC | NC | 32700 | 59600 | 221000 | 208000 | 685000 | 355000 |
| (ng•h/mL) | Day 346 | NC | NC | 34200 | 26600 | 247000 | 193000 | 401000 | 482000 |
| Cmax | Day 1 | NA | NA | 19300 | 26000 | 67400 | 62400 | 211000 | 109000 |
| (ng/mL) | Day 346 | NA | NA | 17100 | 8440 | 66400 | 59600 | 122000 | 137000 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | | |
| Sacrificed moribund | | 0 | 2 [c] | 1 [c] | 0 | 2 [c] | 1 [c] | 0 | 0 |
| Mean Body weight (%) [a] | | 340.3 g | 385.7 g | + 15.4 | +2.5 | +7.7 | -11.7 | +11.6 | -7.3 |

## 2.6.7.7 J 反復投与毒性試験（続き）

Report title: AHU377: 52-week oral (gavage) toxicity study in marmosets with a 4-week recovery period Study no. 0570307

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control – Group 1) | | 25 (Group 2) | | 100 (Group 3) | | 200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 5 + 2 | F: 5 + 4 | M: 5 | F: 5 | M: 5 | F: 5 | M: 5 + 3 | F: 5 + 3 |
| **Noteworthy findings:** | | | | | | | | |
| Clinical observations: | | | | | | | | |
| Emesis (with, without feed, apparent compound) | - | - | - | - | P | P | P | P |
| Estimated food consumption: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Electrocardiography: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Urinalysis: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights (%) [d]: | | | | | | | | |
| Thyroid gland | 0.3127 g | - | -27.93 | - | -65.76 | - | -74.20[#] | - |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Thyroid gland–reduced colloid | 1 | - | 4 | - | 5 | - | 5 | - |
| **Postdose evaluation:** | | | | | | | | |
| Number evaluated | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| Organ weights (%) [d]: | | | | | | | | |
| Thyroid gland | 0.23285 g | - | NA | NA | NA | NA | -59.72 | - |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Thyroid gland–reduced colloid | 0 | - | NA | NA | NA | NA | 3 | - |

- = no noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable; P = present
a = at the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
b = Animal no. 1007 was assigned to study as a male but was determined to be a female at time of necropsy (day 185). c = Not considered test article related.
d = For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
# $p<0.05$ (Dunn's test)

## 2.6.7.8 *In vitro* 遺伝毒性試験

## 2.6.7.8 A *In vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: LCZ696: Mutagenicity test using Salmonella typhimurium
Study No.: [0612017]
Test for Induction of: Reverse gene mutations
No. of Independent Assays: 4
Location in CTD: 4.2.3.3.1-1
Strains: *S.typhimurium* TA1535, TA97a, TA98, TA100, TA102
No. of Replicate Cultures: 3
GLP Compliance: Yes
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9, 25 µl/plate
No. of Cells Analyzed/Culture: ca.$10^8$
Experimental start date: [redacted]
Vehicles: For Test Article: DMSO; For Positive Controls: DMSO
Treatment: Plate incorporation or preincubation (20 min at 37°C), 3 days incubation

Cytotoxic Effects: No bacteriotoxicity of the test item was observed in the first and second experiment (both plate incorporation). In the third experiment (preincubation) LCZ696 was bacteriotoxic at ≥ 2500 µg/plate in strains TA1535, TA100 and TA98, -S9. In strains TA1535 +S9 and TA97a -S9 bacteriotoxicity was seen at 5000 µg/plate. LCZ696 was not bacteriotoxic using strains TA97a, TA98 and TA100, +S9. In experiment 3 using strain TA102 +/- S9 no background growth was obtained for the negative and positive controls and all test item concentrations. However, this was probably related to an experimental error (insufficient number of bacterial cells due to bad overnight growth) and is not considered to reflect a bacteriotoxic effect of LCZ696 or the positive controls. In the fourth experiment (preincubation) the test item showed evidence of bacteriotoxicity at 5000 µg/plate in strain TA102 +/- S9.

Genotoxic Effects: No genotoxic effect

### Results (numbers represent mean colony numbers per dose group):

### Experiment 1 (plate incorporation)

| Strain: | | TA100 | |
|---|---|---|---|
| S9: | | - | + |
| Concentration (µg/ plate): | 0 | 152 | 156 |
| | 5 | 146 | 139 |
| | 50 | 150 | 148 |
| | 500 | 150 | 151 |
| | 5000 | 149 | 142 |

**Positive controls:** Without S9: Sodium azide (3 µg/plate)
With S9: 2-Aminoanthracene (3 µg/plate)

Effects of positive controls: Clearly genotoxic

## 2.6.7.8 A *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: LCZ696: Mutagenicity test using Salmonella typhimurium Study No.: 0612017

### Experiment 2 (plate incorporation)

| Strain: | | TA1535 | | TA97a | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S9: | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Concentration (µg/plate): | 0 | 26 | 18 | 197 | 179 | 51 | 60 | 151 | 132 | 334 | 386 |
| | 8 | 28 | 18 | 200 | 193 | 55 | 59 | 147 | 136 | 357 | 379 |
| | 40 | 28 | 15 | 201 | 180 | 58 | 58 | 143 | 118 | 369 | 408 |
| | 200 | 25 | 17 | 190 | 207 | 57 | 64 | 141 | 103 | 360 | 390 |
| | 1000 | 29 | 19 | 191 | 192 | 53 | 58 | 145 | 130 | 362 | 359 |
| | 5000 | 24 | 17 | 171 | 197 | 57 | 67 | 145 | 121 | 391 | 430 |

**Positive controls:** Without S9: Sodium azide (3 µg/plate), 9-Aminoacridine (100 µg/plate), 2-Nitrofluorene (2 µg/plate), Mitomycin C (0.5 µg/plate)
With S9: 2-Aminoanthracene (3 or 10 µg/plate), Benzo(a)pyrene (3 µg/plate)

Effects of positive controls: Clearly genotoxic

## 2.6.7.8 A *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: LCZ696: Mutagenicity test using Salmonella typhimurium Study No.: 0612017

### Experiment 3 (preincubation)

| Strain: | | TA1535 | | TA97a | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S9: | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Concentration (µg/ plate): | 0 | 21 | 22 | 198 | 179 | 52 | 57 | 141 | 154 | t | t |
| | 312.5 | 29 | 16 | 190 | 187 | 38 | 61 | 141 | 154 | t | t |
| | 625 | 25 | 21 | 205 | 174 | 57 | 55 | 159 | 152 | t | t |
| | 1250 | 24 | 25 | 206 | 194 | 50 | 66 | 130 | 130 | t | t |
| | 2500 | 16t | 23 | 212 | 159 | 26t | 59 | 128t | 148 | t | t |
| | 5000 | 22t | 19t | 204t | 188 | 24t | 49 | 135t | 159 | t | t |

t: toxic

**Positive controls:** Without S9: Sodium azide (3 µg/plate), 9-Aminoacridine (100 µg/plate), 2-Nitrofluorene (2 µg/plate), Mitomycin C (0.5 µg/plate)
With S9: 2-Aminoanthracene (3 or 10 µg/plate), Benzo(a)pyrene (3 µg/plate)

Effects of positive controls: Clearly genotoxic, except mitomycin C (0.5 µg/plate) and 2-aminoanthracene (10 µg/plate) using strain TA102 +/- S9 due to an experimental error (no bacteria plated) and 2-nitrofluorene (2 µg/plate) using strain TA98 -S9 (a factor of 1.9 was achieved)

## 2.6.7.8 A *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: LCZ696: Mutagenicity test using Salmonella typhimurium Study No.: 0612017

### Experiment 4 (preincubation)

| Strain: | | TA102 | |
|---|---|---|---|
| S9: | | - | + |
| Concentration (µg/ plate): | 0 | 304 | 350 |
| | 312.5 | 326 | 363 |
| | 625 | 331 | 366 |
| | 1250 | 312 | 371 |
| | 2500 | 333 | 361 |
| | 5000 | 159tp | 333t |

t: toxic, p: precipitation

**Positive controls:** Without S9: Mitomycin C (0.5 µg/plate)
With S9: 2-Aminoanthracene (10 µg/plate)

Effects of positive controls: Clearly genotoxic

## 2.6.7.8 B *In vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: LCZ696: Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes
Study No.: [0770050]
Test for Induction of: Chromosome aberrations
Location in CTD: 4.2.3.3.1-2
No. of Independent Assays: 2
GLP Compliance: yes
Cell type: Primary human lymphocytes
No. of Replicate Cultures: 4 (vehicle) 2 (test item and positive controls)
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S-9, 2%
Vehicles: For Test item: Purified water; For Positive Controls: DMSO
No. of Cells Analyzed/Culture: 100 (where appropriate)
Treatment: Continuous treatment for 20 hours without S-9; pulse treatment for 3 hours and recovery time 17 hours with and without S-9
Experimental start date: [redacted]
Cytotoxic Effects: Concentration-related decreases in mitotic indices
Genotoxic Effects: None

### Experiment 1: 3-hour treatment, 17-hour recovery in the absence of S-9

| Metabolic Activation | Test item | Concentration (μg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Without activation | Purified water | 0 | 100 | 1.0 | 0.010 | 0 |
| | LCZ696 | 300.0 | 96 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | | 700.0 | 75 | 1.5 | 0.015 | 2 |
| | | 1200 | 52 | 1.0 | 0.010 | 1 |
| | | 1300 | 48 | 1.5 | 0.015 | 0 |
| | 4-Nitroquinoline 1-oxide | 2.50 | - | 25.2*** | 0.406 | 1 |

a = Based on mitotic indices.
*** $p \leq 0.001$ (Fisher's exact Test)

### 2.6.7.8 B *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: LCZ696: Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes Study No.: 0770050

**Experiment 1: 3-hour treatment, 17-hour recovery in the presence of S-9**

| Metabolic Activation | Test item | Concentration (μg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| With activation | Purified water | 0 | 100 | 0.0 | 0.000 | 0 |
| | LCZ696 | 1100 | 97 | 0.5 | 0.005 | 1 |
| | | 1400 | 75 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | | 1800 | 59 | 1.5 | 0.015 | 0 |
| | Cyclophosphamide | 12.50 | - | 33.1*** | 0.463 | 0 |

a = Based on mitotic indices.

*** $p \leq 0.001$ (Fisher's exact Test)

**Experiment 2: 20-hour treatment, 0-hour recovery in the absence of S-9**

| Metabolic Activation | Test item | Concentration (μg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Without activation | Purified water | 0 | 100 | 0.5 | 0.005 | 2 |
| | LCZ696 | 100.0 | 100 | 0.0 | 0.000 | 0 |
| | | 200.0 | 71 | 1.0 | 0.010 | 0 |
| | | 300.0 | 48 | 1.5 | 0.015 | 0 |
| | 4-Nitroquinolene 1-oxide | 2.50 | - | 7.0*** | 0.110 | 1 |
| | | 5.00 | - | 19.6*** | 0.283 | 0 |

a = Based on mitotic indices.

*** $p \leq 0.001$ (Fisher's exact Test)

## 2.6.7.8 B *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: LCZ696: Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes Study No.: 0770050

### Experiment 2: 3-hour treatment, 17-hour recovery in the presence of S-9

| Metabolic Activation | Test item | Concentration (μg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| With activation | Purified water | 0 | 100 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | LCZ696 | 1000 | 86 | 1.0 | 0.010 | 1 |
| | | 1400 | 70 | 1.0 | 0.015 | 0 |
| | | 1500 | 63 | 1.0 | 0.010 | 0 |
| | | 2000 | 27 | 2.5 | 0.025 | 0 |
| | Cyclophosphamide | 6.25 | - | 41.7*** | 0.615 | 0 |

a = Based on mitotic indices.

*** $p \leq 0.001$ (Fisher's exact Test)

## 2.6.7.8 C *In vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: AHU377: Mutagenicity test using Salmonella typhimurium
Test for Induction of: Reverse gene mutations
No. of Independent Assays: 2
Strains: *S.typhimurium* TA1535, TA97a, TA98, TA100, TA102
Metabolizing System: Rat liver S9, 25 µl/plate
Vehicles: For Test Article: DMSO; For Positive Controls: DMSO
Treatment: Plate incorporation or preincubation (20 min at approximately 37°C), 3 days incubation
Cytotoxic Effects: No bacteriotoxicity up to 5000 µg/plate
Genotoxic Effects: Not genotoxic within dose-range tested

Study No.: [0412008]
Location in CTD: 4.2.3.3.1-3
GLP Compliance: yes
No. of Replicate Cultures: 3
No. of Cells Analyzed/Culture: ca.$10^8$
Experimental start date: [redacted]

### Results (numbers represent mean colony numbers per dose group):

### Experiment 1 (plate incorporation)

| Strain: | | TA1535 | | TA97a | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S9: | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Concentration (µg/ plate): | 0 | 24 | 26 | 174 | 182 | 41 | 31 | 131 | 143 | 274 | 279 |
| | 8 | 22 | 13 | 165 | 157 | 32 | 29 | 127 | 129 | 234 | 253 |
| | 40 | 19 | 18 | 204 | 173 | 26 | 31 | 112 | 141 | 250 | 287 |
| | 200 | 25 | 14 | 141 | 189 | 24 | 29 | 128 | 144 | 240 | 291 |
| | 1000 | 24 | 16 | 165 | 160 | 29 | 32 | 130 | 145 | 241 | 261 |
| | 5000 | 19 | 18 | 162 | 158 | 29 | 30 | 129 | 124 | 222 | 261 |

**Positive controls:** Without S9: Sodium azide (3 µg/plate), 9-Aminoacridine (100 µg/plate), 2-Nitrofluorene (2 µg/plate), Mitomycin C (0.5 µg/plate)
With S9: 2-Aminoanthracene (3 or 10 µg/plate), Benzo(a)pyrene (3 µg/plate)
Effects of positive controls: Clearly genotoxic

## 2.6.7.8 C *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: AHU377: Mutagenicity test using Salmonella typhimurium Study No.: 0412008

### Experiment 2 (preincubation)

| Strain: | | TA1535 | | TA97a | | TA98 | | TA100 | | TA102 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S9: | | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + |
| Concentration (µg/ plate): | 0 | 26 | 21 | 175 | 174 | 37 | 37 | 122 | 115 | 221 | 230 |
| | 312.5 | 25 | 21 | 165 | 172 | 40 | 32 | 130 | 113 | 225 | 231 |
| | 625 | 20 | 20 | 167 | 177 | 35 | 32 | 122 | 103 | 221 | 235 |
| | 1250 | 21 | 22 | 179 | 176 | 32 | 34 | 132 | 117 | 225 | 237 |
| | 2500 | 26 | 16 | 158 | 162 | 28 | 34 | 138 | 126 | 233 | 236 |
| | 5000 | 21p | 17p | 155p | 189p | 26p | 29p | 143p | 122p | 225p | 222p |

p: precipitation

Positive controls: Without S9: Sodium azide (3 µg/plate), 9-Aminoacridine (100 µg/plate), 2-Nitrofluorene (2 µg/plate), Mitomycin C (0.5 µg/plate)
With S9: 2-Aminoanthracene (3 or 10 µg/plate), Benzo(a)pyrene (3 µg/plate)

Effects of positive controls: Clearly genotoxic

## 2.6.7.8 D *In vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: Evaluation of the ability of AHU377 to induce chromosome aberrations in cultured peripheral human lymphocytes
Test for Induction of: Chromosome aberrations
No. of Independent Assays: 2
Cell type: Primary human lymphocytes
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9, 1.8% (v/v)
Vehicles: For Test item: DMSO, for Positive controls: Hanks' balanced salt solution (HBSS)
Treatment: Continuous treatment for 24 h without S9; treatment for 3 h and fixation time 24 h with and without S9
Cytotoxic Effects: Dose-related decreases in mitotic indices at the 24 h continuous treatment time
Genotoxic Effects: No biologically relevant induction of chromosome aberrations

Study No.: [0420038]
Location in CTD: 4.2.3.3.1-4
GLP Compliance: yes
No. of Replicate Cultures: 2
No. of Cells Analyzed/Culture: 100
Experimental start date: [redacted]

### Experiment 1: 3-hour treatment, 24-hour fixation time in the absence of S-9

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (µg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Without activation | DMSO | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| | AHU377 | 33 | 101 | 0 | 0 | 0 |
| | | 100 | 106 | 0 | 0 | 0 |
| | | 333 [b] | 95 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | Mitomycin C | 0.5 | 58 | 47.3*** | 0.700 | 0 |

*** P < 0.001 (Chi-square test); DMSO = dimethyl sulfoxide; MMC-C = mitomycin C
a = Based on mitotic indices.
b = AHU377 precipitated in the culture medium.

## 2.6.7.8 D *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: Evaluation of the ability of AHU377 to induce chromosome aberrations in cultured peripheral human lymphocytes Study No.: 0420038

### Experiment 1: 3-hour treatment, 24-hour fixation time in the presence of S-9

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (µg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| With activation | DMSO | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| | AHU377 | 33 | 108 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | | 100 | 107 | 0 | 0 | 0 |
| | | 333[b] | 112 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | Cyclophosphamide | 15 | 47 | 26.5*** | 0.305 | 0 |

*** P < 0.001 (Chi-square test)

a = Based on mitotic indices.

b = AHU377 precipitated in the culture medium.

### Experiment 2: 24-hour treatment, 24-hour fixation time in the absence of S-9

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (µg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Without activation | DMSO | 0 | 100 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | AHU377 | 100 | 108 | 1.5 | 0.015 | 0 |
| | | 400[b] | 64 | 3.0 | 0.030 | 0 |
| | | 500[b] | 47 | 3.0 | 0.030 | 0 |
| | Mitomycin C | 0.2 | 59 | 29.5*** | 0.365 | 0 |

*** P < 0.001 (Chi-square test)

a = Based on mitotic indices.

b = AHU377 precipitated in the culture medium.

## 2.6.7.8 D *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: Evaluation of the ability of AHU377 to induce chromosome aberrations in cultured peripheral human lymphocytes Study No.: 0420038

### Experiment 2: 3-hour treatment, 24-hour fixation time in the presence of S-9

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (µg/mL) | Cytotoxicity [a] (% of control) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| With activation | DMSO | 0 | 100 | 0.5 | 0.005 | 0 |
| | AHU377 | 33 | 105 | 1.5 | 0.015 | 0 |
| | | 100 | 110 | 1.0 | 0.010 | 0 |
| | | 333[b] | 104 | 2.0 | 0.020 | 0 |
| | Cyclophosphamide | 15 | 57 | 29.5*** | 0.345 | 0 |

*** P < 0.001 (Chi-square test)

a = Based on mitotic indices.

b = AHU377 precipitated in the culture medium.

## 2.6.7.8 E *In vitro* 遺伝毒性試験

Report Title: LBQ657: Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes
Study No.: [1170562]
Test for Induction of: Chromosome aberrations
Location in CTD: 4.2.3.3.1-5
No. of Independent Assays: 2
GLP Compliance: Yes
Cell type: Primary human lymphocytes
No. of Replicate Cultures: 4 (vehicle) 2 (test item and positive controls)
Metabolizing System: Aroclor induced rat liver S-9
No. of Cells Analysed/Culture: 100 (where appropriate)
Vehicles: For Test Item: Dimethyl sulphoxide (DMSO); For Positive Controls: DMSO
Experimental start date: [redacted]
Treatment: Continuous treatment for 20 hours without S-9; pulse treatment for 3 hours with and without S9, recovery time 17 hours
Cytotoxic Effects: Concentration related decreases in mitotic indices (also limited by the observation of post-treatment precipitate for 3 hour treatments without and with S-9).
Genotoxic Effects: None.

### Experiment 1: 3-hour treatment in the absence of S-9, 17-hour recovery

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (µg/mL) | Cytotoxicity [a] (%) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Without activation | DMSO | 0 | - | 1.50 | 0.015 | 1 |
| | LBQ657 | 1200 | 0 P | 1.00 | 0.010 | 0 |
| | | 1800 | 2 P | 0.00 | 0.000 | 0 |
| | | 2400 | 19 PEH | 1.00 | 0.015 | 0 |
| | 4-Nitroquinoline 1-oxide | 5.00 | ND | 19.34*** | 0.331 | 0 |

a = Based on mitotic indices; P = Precipitation observed at the beginning of the treatment incubation period; E = Precipitation observed at the end of treatment; H = Precipitation observed at harvest; ND = Not determined; *** $p < 0.001$ (Fisher's exact Test);

### 2.6.7.8 E *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: LBQ657: Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes Study No.: 1170562

**Experiment 1: 3-hour treatment in the presence of S-9, 17-hour recovery**

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (μg/mL) | Cytotoxicity [a] (%) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| With activation | DMSO | 0 | - | 0.50 | 0.010 | 1 |
| | LBQ657 | 1200 | 0 P | 0.50 | 0.005 | 0 |
| | | 2400 | 13 P | 1.00 | 0.015 | 0 |
| | | 2800 | 30 PE | 1.00 | 0.010 | 0 |
| | Cyclophosphamide | 12.5 | ND | 64.52*** | 1.113 | 0 |

a = Based on mitotic indices; P = Precipitation observed at the beginning of the treatment incubation period; E = Precipitation observed at the end of treatment; ND = Not determined; *** $p < 0.001$ (Fisher's exact Test)

**Experiment 2: 20-hour treatment in the absence of S-9, 0-hour recovery**

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (μg/mL) | Cytotoxicity [a] (%) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Without activation | DMSO | 0 | - | 0.50 | 0.005 | 1 |
| | LBQ657 | 300.0 | 0 | 0.50 | 0.005 | 0 |
| | | 600.0 | 0 P | 1.00 | 0.015 | 1 |
| | | 1000 | 17 P | 0.50 | 0.005 | 0 |
| | | 1400 | 50 P | 0.00 | 0.000 | 1 |
| | 4-Nitroquinoline 1-oxide | 5.00 | ND | 18.32*** | 0.267 | 0 |

a = Based on mitotic indices; P = Precipitation observed at the beginning of the treatment incubation period; ND = Not determined; *** $p < 0.001$ (Fisher's exact Test);

### 2.6.7.8 E *In vitro* 遺伝毒性試験（続き）

Report Title: LBQ657: Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes Study No.: 1170562

**Experiment 2: 3-hour treatment in the presence of S-9, 17-hour recovery**

| Metabolic Activation | Test Item | Concentration (μg/mL) | Cytotoxicity [a] (%) | Aberrant Cells Mean % | Abs/Cell | Total Polyploid Cells |
|---|---|---|---|---|---|---|
| With activation | DMSO | 0 | - | 2.25 | 0.023 | 0 |
| | LBQ657 | 1500 | 15 P | 0.00 | 0.000 | 1 |
| | | 2300 | 21 P | 1.00 | 0.010 | 0 |
| | | 3400 | 27 PE | 2.50 | 0.025 | 2 |
| | Cyclophosphamide | 12.5 | ND | 63.08*** | 1.000 | 0 |

a = Based on mitotic indices; P = Precipitation observed at the beginning of the treatment incubation period; E = Precipitation observed at the end of treatment; ND = Not determined;
*** $p < 0.001$ (Fisher's exact Test);

## 2.6.7.9 *In vivo* 遺伝毒性試験

## 2.6.7.9 A *In vivo* 遺伝毒性試験

Report Title: LCZ696: Rat bone marrow micronucleus test after oral administration

Study No.: [0770051]

Test for Induction of: Micronuclei (in femoral bone marrow)

Treatment Schedule: Once daily via oral gavage for two consecutive days

Location in CTD: 4.2.3.3.2-1

Species/Strain: Male rats / Crl:WI (Han)

Sampling Time: 24 hours after second dose administration (vehicle and test item); 24 hours after dosing (positive control)

GLP Compliance: Yes

Initial age: 8 weeks (at start of dosing)

Method of Administration: Oral gavage

Experimental start date: [redacted]

Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes (PCE)

Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

No. of Cells Analysed/Animal: 2000 PCE

Positive Control: 20 mg/kg cyclophosphamide. Single oral dose of 2 mg/mL solution prepared in saline

Special Features: None

Toxic/Cytotoxic Effects: No clinical signs were observed in any treated animal

Genotoxic Effects: None. It was concluded that LCZ696 did not induce micronuclei in the polychromatic erythrocytes of the bone marrow of rats treated up to 2000 mg/kg/day.

| Test Article: | Dose (mg/kg) | No. of animals | Mean % PCEs (±SD) | Mean % MN-PCEs (±SD) |
|---|---|---|---|---|
| Vehicle | 0 | M: 6 | 35.37 ± 19.07 | 0.22 ± 0.18 |
| LCZ696 | 500 | M: 6 | 43.00 ± 5.12 | 0.08 ± 0.05 |
| | 1000 | M: 6 | 41.13 ± 6.72 | 0.16 ± 0.18 |
| | 2000 | M: 6 | 41.68 ± 7.01 | 0.08 ± 0.07 |
| Cyclophosphamide [a] | 20 | M: 6 | 31.38 ± 11.05 | 2.54 ± 1.59 |

a = administered once only, 24 hours prior to necropsy; M = male; PCE = polychromatic erythrocytes; MN-PCE = micronucleated PCE; SD = standard deviation

## 2.6.7.9 B *In vivo* 遺伝毒性試験

Report title: AHU377: Oral bone marrow micronucleus test in rats
Study no.: [0412409]
Test for induction of: Micronuclei
Location in CTD: 4.2.3.3.2-2
Species / strain: Male rats / CRL:WI (GLX/BRL/HAN) IGS BR
GLP compliance: Yes
Initial age: 7-8 weeks (at the beginning of the experiments)
Treatment schedule: Two doses 24 h apart
Cells evaluated: Bone marrow
Sampling time: 48 h after first dose
No. of cells analyzed per animal: 4000 PCE
Method of administration: Oral gavage
Toxic / cytotoxic effects: No bone marrow toxicity up to 1250 mg/kg/day being the highest dose that could be tested because of the limits of formulation and the permitted application volume
Vehicle / formulation: 1% (w/v) sodium carboxymethylcellulose / suspension
Genotoxic effects: None
Experimental start date: [redacted]
Evidence of exposure: the only clinical sign was cold paws and tails of the rats after the test article application.

| Test Article: | Dose (mg/kg) | No. of animals | Mean % PCEs (±SD) | Mean % MN-PCEs (±SD) |
|---|---|---|---|---|
| Vehicle: | 0 | M: 7 | 49.3 ± 13.6 | 0.18 ± 0.03 |
| AHU377 | 125 | M: 7 | 51.7 ± 9.7 | 0.18 ± 0.09 |
| | 395 | M: 7 | 51.6 ± 7.5 | 0.14 ± 0.08 |
| | 1250 | M: 7 | 46.5 ± 10.6 | 0.18 ± 0.08 |
| Cyclophosphamide | 10 | M: 3 | 35.1 ± 5.1 | 2.94 ± 0.96 |

M = male; PCE = polychromatic erythrocytes; MN-PCE = micronucleated PCE; SD = standard deviation

# 2.6.7.10 がん原性試験

# 2.6.7.10 A がん原性試験（用量設定試験）

## Non-pivotal studies

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/ CD-1 | Oral (gavage); 50 mM phosphate buffer or 0.5% HPC (Klucel) / suspensions | 1-week | Phosphate buffer: 400, 800<br>HPC: 400, 800, 1200 | M: 25, F: 25 | 1200 | Based on mortality, clinical signs, body weights and gross pathology observations, AHU377 in 0.5% HPC (Klucel) displayed a better tolerability profile than AHU377 in the 50 mM phosphate buffer vehicle.<br>HPC is considered a more suitable vehicle than the phosphate buffer vehicle. | [0770781] | 4.2.3.4.1-1 |
| Mouse/ CD-1 | Oral (gavage); 0.5% HPC (Klucel) / suspensions | 4-weeks | 0, 200, 400, 800, 1200 | M: 10, F: 10 | 1200 | No noteworthy findings | [0770782] | 4.2.3.4.1-2 |

HPC = hydroxypropylcellulose

a = no observed adverse-effect level

## 2.6.7.10 B　がん原性試験（用量設定試験）

Report title: AHU377: 13-week oral (diet) range-finding toxicity study in mice
Study no.: [0570208]
Species/strain: Mouse; Crl:CD-1 (ICR)BR
Duration of dosing: At least 13 weeks
Location in CTD: 4.2.3.4.1-3
Initial age: Approximately 8 weeks
Duration of postdose: None
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral (feed)
Vehicle/formulation: Certified rodent diet 18% #5LG3 meal
No Observed Adverse-Effect Level:1000 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control; Group 1) | | 100 (Group 2) | | 250 (Group 3) | | 500 (Group 4) | | 1000 (Group 5) | | 2000 (Group 6) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | Day 12 | NC | NC | 433 | 713 | 1160 | 855 | 1240 | 1970 | 4540 | 4260 | 9080 | 11400 |
| | Day 76 | NC | NC | 250 | 255 | 4650 | 794 | 463 | 1280 | 2330 | 2180 | 3430 | 5220 |
| Cmax (ng/mL) | Day 12 | NA | NA | 18.0 | 29.7 | 48.3 | 35.6 | 51.7 | 82.1 | 189 | 178 | 378 | 475 |
| | Day 76 | NA | NA | 10.4 | 10.6 | 194 | 33.1 | 19.3 | 53.3 | 97.1 | 90.8 | 143 | 218 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | Day 12 | NC | NC | 2700 | 1760 | 7150 | 4030 | 8660 | 9610 | 25200 | 23400 | 77900 | 37200 |
| | Day 76 | NC | NC | 999 | 1100 | 8050 | 2810 | 5780 | 4440 | 21000 | 8080 | 51000 | 31300 |
| Cmax (ng/mL) | Day 12 | NA | NA | 113 | 73.3 | 298 | 168 | 361 | 400 | 1050 | 975 | 3250 | 1550 |
| | Day 76 | NA | NA | 41.6 | 45.8 | 335 | 117 | 241 | 185 | 875 | 337 | 2130 | 1300 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1[a] | 1[b] |
| Body weight (%) | | 35.7 g | 30.9 g | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption (%) | | 5.6 g/day | 6.1 g/day | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical observationsd | | | | | | | | | | | | | |
| anogenital-perineal staining | | - | - | - | - | P | - | P | - | P | - | P | - |
| spilled feed | | - | - | P | - | P | P | P | P | P | P | P | P |
| Ophthalmoscopy | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

## 2.6.7.10 B　がん原性試験（用量設定試験，続き）

Report title: AHU377: 13-week oral (diet) range-finding toxicity study in mice　Study no.: 0570208

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control; Group 1) | | 100 (Group 2) | | 250 (Group 3) | | 500 (Group 4) | | 1000 (Group 5) | | 2000 (Group 6) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry: | | | | | | | | | | | | |
| ↑ globulin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6007[d] | - |
| ↓ cholesterol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6007[d] | - |
| ↑ ALP | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6508[d] |
| ↑ BUN | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6507[d] |
| ↑ creatinine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6507[d] |
| ↑ P | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6507[d] |
| ↑ K | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 6507[d] |
| Urinalysis: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights (%[c]): | | | | | | | | | | | | |
| Heart | 0.17335 g | 0.17167 g | -1.62 | -11.78 | -8.39 | -10.70 | -1.32 | -13.55 | -6.96 | -13.44 | -8.61 | -16.04[##] |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | | | | | | | | | | | | |
| Lungs | | | | | | | | | | | | |
| bronchiolar-alveolar adenoma | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 |
| bronchiolar-alveolar hyperplasia | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

- = no noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable;
a = animal no. 6022 (Toxicokinetic animal) died on day 8 died due to injuries caused during cage rack change.
b = animal no. 6504 was euthanized in moribund condition on day 42 for reasons unrelated to compound administration.
c = at the end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). ## $p<0.01$ (Dunn's test)
d = animal no.

## 2.6.7.10 C　がん原性試験（用量設定試験）

Report title: AHU377: 13-Week oral (gavage) dose range-finding toxicity study in mice
Study no.: [0770896]
Species/strain: Mouse/Crl:CD-1(ICR) BR
Duration of dosing: 13 Weeks
Location in CTD: 4.2.3.4.1-4
Initial age: approximately 10 weeks (at start of dosing)
Duration of postdose: None
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution/ suspensions

Special features: An additional 10 animals per sex per dose were assigned for toxicokinetic monitoring and were bled on week 11 (n=10) and then removed from the study
No Observed Adverse-Effect Level: 1200 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control; Group 1) | | 400 (Group 2) | | 800 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| Toxicokinetics: AHU377 (week 11) | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | NC | NC | 3380 | 5410 | 8000 | 31300 | 55000 | 33800 |
| Cmax (ng/mL) | NA | NA | 2810 | 4730 | 2480 | 28100 | 17200 | 17900 |
| Toxicokinetics: LBQ657 (week 11) | | | | | | | | |
| AUC0-24h (ng•h/mL) | NC | NC | 106000 | 111000 | 178000 | 337000 | 759000 | 510000 |
| Cmax (ng/mL) | NA | NA | 100000 | 82700 | 44600 | 261000 | 230000 | 268000 |

## 2.6.7.10 C　がん原性試験（用量設定試験，続き）

Report title: 13-Week oral (gavage) range-finding toxicity study in mice Study no. 0770896

| Daily dose (mg/kg): | 0 (Control; Group 1) | | 400 (Group 2) | | 800 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals: | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 | M: 10 | F: 10 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Body weight (% [a]) | 47.6 g | 35.2 g | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption (% [a]) | 6.8 g/day | 8.0 g/day | - | - | - | - | - | - |
| Clinical observations | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ophthalmoscopy: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hematology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Clinical biochemistry: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Organ weights: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gross pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = No noteworthy findings; NC = Not calculated; NA = Not applicable
[a] = At the end of dosing period. Control values are group mean absolute weights.

## 2.6.7.10 D　がん原性試験

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice
Study no.: [0870374]
Species/strain: Mice / CRl:CD1 (ICR)
Duration of dosing: At least 104 weeks
Location in CTD: 4.2.3.4.1-5
Initial age: 7 weeks (at start of dosing)
Method of administration: oral gavage
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution/ suspensions
Treatment of controls: vehicle
Special features: Maximum tolerated dose: 1200 mg/kg/day

| Daily dose (base - mg/kg/day) | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gender | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| Toxicokinetics [a]: AHU377 (ng/mL) | | | | | | | | | |
| Week 4 | 0.5 h | NA | NA | 211 | 784 | 4830 | 13400 | 25800 | 66400 |
| | 1.0 h | NA | NA | 107 | 108 | 683 | 1760 | 5930 | 13000 |
| Week 26 | 0.5 h | NA | NA | 1660 | 2170 | 3350 | 38700 | 33700 | 111000 |
| | 1.0 h | NA | NA | 70.1 | 276 | 1080 | 4530 | 981 | 16700 |
| Toxicokinetics [a]: LBQ657 (ng/mL) | | | | | | | | | |
| Week 4 | 0.5 h | NA | NA | 8610 | 7720 | 55500 | 111000 | 154000 | 301000 |
| | 1.0 h | NA | NA | 4740 | 1540 | 31200 | 32200 | 110000 | 211000 |
| Week 26 | 0.5 h | NA | NA | 24600 | 35700 | 80600 | 306000 | 264000 | 380000 |
| | 1.0 h | NA | NA | 1530 | 3600 | 50700 | 100000 | 81700 | 199000 |
| Number of animals at start: | | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Died/sacrificed moribund: | | 26 | 41 | 34 | 45 | 29 | 41 | 33 | 32 |
| Terminal sacrifice: | | 44 | 29 | 36 | 25 | 41 | 29 | 37 | 38 |
| Survival (%): | | 63 | 41 | 51 | 36 | 59 | 41 | 53 | 54 |
| Body weight (%[b]): | | 48.99 g | 35.37 g | -0.6 | +2.4 | -1.7 | +0.3 | -4.2 | -4.4 |
| Food consumption: | | 4.5 g/day | 3.5 g/day | - | - | - | - | - | - |

## 2.6.7.10 D がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice Study no.: 0870374

| Daily dose (base - mg/kg/day): | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| Gross pathology: | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology – Neoplastic lesions | | | | | | | | | |
| **Abdomen** | (Examined) | 1 | 4 | 2 | 4 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Adrenal** | (Examined) | 69 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 | 69 |
| Adenoma: subcapsular | | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Benign pheochromocytoma | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Adenoma: spindle cell | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Adenoma: cortical | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Aorta** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 | 70 | 70 | 69 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Bone Miscellaneous** | (Examined) | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| Osteosarcoma | | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| **Brain** | (Examined) | 70 | 69 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Metastasis:astrocytoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Cecum** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 |
| Adenocarcinoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| **Clitoral Gland** | (Examined) | NA | 68 | NA | 70 | NA | 69 | NA | 65 |
| Adenocarcinoma | | | 0 | | 1 | | 0 | | 0 |
| **Diaphragm** | (Examined) | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Duodenum** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 | 70 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Adenocarcinoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

## 2.6.7.10 D がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice Study no.: 0870374

| Daily dose (base - mg/kg/day): | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| **Ear** | (Examined) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Neural crest tumor | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Esophagus** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 | 70 | 70 |
| Papilloma: squamous cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| **Eye** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Carcinoma | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Fat** | (Examined) | 8 | 6 | 5 | 10 | 4 | 10 | 4 | 6 |
| Carcinoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Harderian Gland** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Adenoma | | 14 | 2 | 10 | 4 | 12 | 4 | 11 | 3 |
| Adenocarcinoma | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **Head** | (Examined) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Heart** | (Examined) | 69 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Sarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| **Hemolym. Tissue** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Mast cell tumor | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Histiocytic sarcoma | | 2 | 6 | 3 | 8 | 5 | 2 | 4 | 5 |
| Malignant lymphoma | | 11 | 16 | 4 | 19 | 10 | 21 | 6 | 20 |
| **Ileum** | (Examined) | 70 | 69 | 69 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Adenocarcinoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

## 2.6.7.10 D がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice Study no.: 0870374

| Daily dose (base - mg/kg/day): | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| **Jejunum** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Adenocarcinoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| **Kidney** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Adenoma: tubular cell | | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Carcinoma: tubular cell | | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| **Larynx** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 |
| Papilloma: squamous cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| **Liver** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Hemangioma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Adenoma: hepatocellular | | 14 | 2 | 11 | 1 | 18 | 0 | 12 | 1 |
| Carcinoma: hepatocellular | | 3 | 0 | 5 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Hemagiosarcoma | | 4 | 0 | 4 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Lung** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Adenoma: alveolar/bronchiolar | | 18 | 11 | 9 | 2 | 14 | 2 | 8 | 3 |
| Metastasis: mesothelioma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Sarcoma | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: alveolar/bronchiolar | | 16 | 5 | 12 | 3 | 17 | 9 | 6 | 5 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| **Lymph node** | (Examined) | 13 | 18 | 12 | 24 | 13 | 23 | 13 | 13 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

## 2.6.7.10 D がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice Study no.: 0870374

| Daily dose (base - mg/kg/day): | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| **L. Node Mesenteric** | (Examined) | 70 | 68 | 70 | 68 | 68 | 69 | 69 | 65 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hemangioma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Mammary Gland** | (Examined) | 11 | 68 | 16 | 70 | 13 | 68 | 8 | 67 |
| Adenocarcinoma | | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Musc. Skel. Misc.** | (Examined) | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| Rhabdomyosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Ovary** | (Examined) | NA | 70 | NA | 70 | NA | 70 | NA | 70 |
| Leiomyoma | | | 0 | | 1 | | 0 | | 0 |
| Cystadenoma | | | 2 | | 1 | | 4 | | 2 |
| Benign thecoma | | | 0 | | 0 | | 1 | | 0 |
| Benign luteoma | | | 2 | | 1 | | 0 | | 0 |
| Malignant luteoma | | | 0 | | 0 | | 1 | | 0 |
| Malignant granulosa-theca cell tumor | | | 0 | | 1 | | 0 | | 0 |
| Hemagiosarcoma | | | 1 | | 0 | | 0 | | 0 |
| **Pancreas** | (Examined) | 70 | 70 | 69 | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Parathyroid Gland** | (Examined) | 46 | 48 | 38 | 49 | 46 | 53 | 40 | 51 |
| Adenoma | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Pericardium** | (Examined) | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Pituitary** | (Examined) | 69 | 70 | 68 | 64 | 68 | 70 | 67 | 70 |
| Adenoma: pars distalis | | 0 | 4 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Adenoma: pars intermedia | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| Carcinoma: pars intermedia | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

## 2.6.7.10 D がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice Study no.: 0870374

| Daily dose (base - mg/kg/day): | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| **Preputial Gland** | (Examined) | 69 | NA | 70 | NA | 70 | NA | 69 | NA |
| Carcinoma | | 0 | | 1 | | 0 | | 0 | |
| **Prostate** | (Examined) | 70 | NA | 70 | NA | 70 | NA | 70 | NA |
| Adenoma | | 0 | | 1 | | 0 | | 0 | |
| Adenocarcinoma | | 1 | | 0 | | 0 | | 0 | |
| **Saliv. Gl. Mandibular** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 69 |
| Malignant myoepithelioma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Saliv. Gl. Parotid** | (Examined) | 70 | 70 | 69 | 69 | 70 | 69 | 70 | 67 |
| Sarcoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Seminal Vesicle** | (Examined) | 70 | NA | 70 | NA | 70 | NA | 70 | NA |
| Sarcoma | | 0 | | 0 | | 1 | | 0 | |
| **Skin Miscellaneous** | (Examined) | 6 | 3 | 5 | 7 | 6 | 5 | 9 | 1 |
| Papilloma: squamous cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: basal cell | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: squamous cell | | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Spinal Cord Cervical** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Malignant astrocytoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Spleen** | (Examined) | 70 | 70 | 69 | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |

## 2.6.7.10 D がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice Study no.: 0870374

| Daily dose (base - mg/kg/day): | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| **Stomach** | (Examined) | 70 | 69 | 70 | 70 | 69 | 70 | 69 | 70 |
| Adenoma | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sarcoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Adenocarcinoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: squamous cell | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| **Subcu. Tissue** | (Examined) | 3 | 13 | 5 | 15 | 2 | 8 | 6 | 8 |
| Lipoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Fibrosarcoma | | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Malignant histiocytic fibroma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **Testis** | (Examined) | 70 | NA | 70 | NA | 70 | NA | 70 | NA |
| Hemangioma | | 0 | | 0 | | 0 | | 1 | |
| Adenoma : interstitial cell | | 2 | | 1 | | 3 | | 3 | |
| **Thorax** | (Examined) | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| Carcinoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Mesothelioma (M) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Thymus** | (Examined) | 67 | 70 | 68 | 70 | 65 | 68 | 67 | 67 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Metastasis : mesothelioma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Thyroid** | (Examined) | 69 | 70 | 70 | 69 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Adenoma : follicular cell | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| Carcinoma : follicular cell | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| **Tongue** | (Examined) | 70 | 70 | 70 | 69 | 70 | 70 | 70 | 68 |
| Papilloma : squamous cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

## 2.6.7.10 D がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in mice Study no.: 0870374

| Daily dose (base - mg/kg/day): | | 0 (Control – Group 1) | | 150 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 1200 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 | M: 70 | F: 70 |
| **Uterus** | (Examined) | NA | 70 | NA | 69 | NA | 70 | NA | 69 |
| Polyp : endometrial stroma | | | 3 | | 6 | | 5 | | 4 |
| Deciduoma | | | 1 | | 0 | | 0 | | 1 |
| Hemangioma | | | 0 | | 0 | | 1 | | 0 |
| Leiomyoma | | | 3 | | 2 | | 1 | | 4 |
| Leiomyosarcoma | | | 1 | | 0 | | 2 | | 2 |
| Sarcoma : endometrial stromal | | | 0 | | 2 | | 0 | | 2 |
| Hemangiosarcoma | | | 2 | | 0 | | 1 | | 0 |
| Adenocarcinoma : endometrial | | | 0 | | 0 | | 1 | | 0 |
| **Urinary Bladder** | (Examined) | 70 | 68 | 70 | 66 | 70 | 70 | 70 | 67 |
| Leiomyosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hemangiosarcoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Vagina** | (Examined) | NA | 69 | NA | 69 | NA | 69 | NA | 69 |
| Polyp | | | 1 | | 0 | | 1 | | 0 |
| Sarcoma : metastasis | | | 0 | | 0 | | 0 | | 1 |
| Histopathology – Non-neoplastic lesions: | | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = no noteworthy findings; NA = Not applicable

[a] = Toxicokinetic assessments were only done on the satellite group of toxicokinetic animals.

[b] = at 6 months. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. No statistical differences in mean body weights were reported.

## 2.6.7.10 E　がん原性試験

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats
Study no. [0870373]
Species/strain: Rats / Crl:WI (Han)
Duration of dosing: At least 104 weeks
Location in CTD: 4.2.3.4.1-6
Initial age: 8 weeks (at start of dosing)
Method of administration: oral gavage
GLP compliance: yes
Date of first dose: [redacted]
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution/ suspensions
Treatment of controls: vehicle

Special features: 4 additional males and 4 additional females per group were bled in weeks 4 and 26 (2 animals/sex/group/time point) for toxicokinetic monitoring of AHU377 and LBQ657 then euthanized following final blood collection.

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gender | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| Toxicokinetics: AHU377 (ng/mL) | | | | | | | | | |
| Week 4 | 0.5 h | NA | NA | 105 | 63.4 | 234 | 231 | 912 | 214 |
| | 1.0 h | NA | NA | 70.1 | 66.2 | 272 | 259 | 676 | 687 |
| Week 26 | 0.5 h | NA | NA | 124 | 88.9 | 411 | 598 | 1510 | 2110 |
| | 1.0 h | NA | NA | 87.4 | 91.5 | 132 | 457 | 531 | 1000 |
| Toxicokinetics: LBQ657 (ng/mL) | | | | | | | | | |
| Week 4 | 0.5 h | NA | NA | 5230 | 3610 | 11500 | 9730 | 29100 | 12800 |
| | 1.0 h | NA | NA | 5380 | 5020 | 9540 | 14000 | 29800 | 23800 |
| Week 26 | 0.5 h | NA | NA | 11900 | 5840 | 15600 | 28700 | 25300 | 58100 |
| | 1.0 h | NA | NA | 5690 | 13200 | 8500 | 30500 | 27900 | 54200 |
| Number of animals at start: | | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Died/sacrificed moribund: | | 13 | 20 | 12 | 20 | 15 | 16 | 19 | 17 |
| Terminal sacrifice: | | 37 | 30 | 38 | 30 | 35 | 34 | 31 | 33 |
| Survival (%): | | 74 | 60 | 76 | 60 | 70 | 68 | 62 | 66 |
| Body weight [1]: | | 502.6 g | 276.5 g | - | - | - | - | - | - |
| Food consumption [1]: | | 20.3 g/day | 14.7 g/day | - | - | - | - | - | - |

## 2.6.7.10 E　がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats　Study no. 0870373

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| Gross pathology: | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Histopathology – Neoplastic lesions | | | | | | | | | |
| **Abdomen** | (Examined) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Malignant schwannoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| **Adrenal** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Adenoma: cortical | | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 0 | 3 |
| Carcinoma: cortical | | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Benign pheochromocytoma | | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| Ganglioneuroma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| **Bone Miscellaneous** | (Examined) | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Osteosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Bone-Sternum** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Sarcoma: metastatis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Brain** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Malignant astrocytoma | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Malignant mixed glioma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Benign granular cell tumor | | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Malignant granular cell tumor | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Malignant meningioma | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Malignant oligodendroglioma | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Benign pineal gland tumor | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Duodenum** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

## 2.6.7.10 E　がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats Study no. 0870373

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| **Epididymis** | (Examined) | 50 | NA | 50 | NA | 50 | NA | 49 | NA |
| Mesothelioma (B) | | 1 | | 0 | | 0 | | 0 | |
| **Esophagus** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Eye** | (Examined) | 49 | 49 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Fat** | (Examined) | 6 | 10 | 7 | 7 | 4 | 6 | 5 | 4 |
| Lipoma | | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Liposarcoma | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **Heart** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Malignant schwannoma: endocardial | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Hemolym. Tissue** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Malignant lymphoma | | 1 | 1 | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| Histiocytic sarcoma | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Leukemia: granulocytic | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Jejunum** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Leiomyosarcoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Benign schwannoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

## 2.6.7.10 E　がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats　Study no. 0870373

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| **Kidney** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Carcinoma: metastasis | | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: tubular cell | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Papilloma: transitional cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Lipoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| **Liver** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Adenoma: hepatocellular | | 3 | 3 | 2 | 5 | 4 | 3 | 6 | 5 |
| Carcinoma: hepatocellular | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| **Lung** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Carcinoma: alveolar/bronchiolar | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Adenoma: alveolar/bronchiolar | | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Lymph node** | (Examined) | 4 | 8 | 6 | 11 | 7 | 9 | 12 | 5 |
| Hemangioma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **L. Node Mesenteric** | (Examined) | 50 | 50 | 49 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Hemangioma | | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 |
| Hemangiosarcoma | | 1 | 0 | 2 | 1 | 4 | 0 | 1 | 0 |

## 2.6.7.10 E　がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats　Study no. 0870373

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| **Mammary Gland** | (Examined) | 43 | 50 | 44 | 50 | 43 | 50 | 42 | 50 |
| Adenoma | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Adenocarcinoma | | 0 | 6 | 0 | 2 | 0 | 6 | 0 | 2 |
| Fibroadenoma | | 0 | 13 | 0 | 9 | 0 | 15 | 0 | 19 |
| **Muscle Skeletal Misc.** | (Examined) | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| **Ovary** | (Examined) | NA | 50 | NA | 50 | NA | 50 | NA | 50 |
| Adenoma: tubulostromal | | | 1 | | 2 | | 2 | | 1 |
| Adenoma: sertoliform tubular | | | 1 | | 0 | | 0 | | 0 |
| Carcinoma: yolk sac | | | 1 | | 0 | | 0 | | 0 |
| **Oviduct** | (Examined) | NA | 49 | NA | 50 | NA | 47 | NA | 48 |
| Carcinoma: metastasis | | | 0 | | 1 | | 0 | | 0 |
| **Pancreas** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Adenoma: islet cell | | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| Carcinoma: islet cell | | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Adenoma: acinar cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| **Parathyroid Gland** | (Examined) | 47 | 49 | 49 | 50 | 50 | 49 | 49 | 49 |
| Adenoma | | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| **Pituitary** | (Examined) | 49 | 50 | 49 | 50 | 50 | 50 | 49 | 49 |
| Adenoma: pars distalis | | 13 [a] | 33 | 12 | 32 | 15 | 32 | 21 [c] | 30 |
| Adenoma: pars intermedia | | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Carcinoma: pars distalis | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: pars intermedia | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

## 2.6.7.10 E　がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats　Study no. 0870373

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| **Rectum** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Fibroma | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Saliv. Gl. Mandibular** | (Examined) | 50 | 49 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Adenoma | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Skin** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Adenoma: basal cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| **Skin Miscellaneous** | (Examined) | 18 | 5 | 19 | 4 | 16 | 6 | 13 | 2 |
| Fibroma | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Adenoma: basal cell | | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: basal cell | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Adenoma: sebaceous | | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Papilloma: squamous cell | | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Carcinoma: squamous cell | | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Keratoacanthoma | | 10 | 0 | 2 | 0 | 8 | 0 | 5 | 0 |
| Hemangioma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Benign melanoma | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Spinal Cord Cervical** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 48 | 49 | 50 |
| Benign astrocytoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Spleen** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Stomach** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Papilloma: squamous cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Carcinoma: squamous cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Leiomyosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

## 2.6.7.10 E　がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats　Study no. 0870373

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| **Subcutaneous Tissue** | (Examined) | 10 | 3 | 8 | 0 | 9 | 3 | 5 | 2 |
| Fibroma | | 4 | 0 | 5 | 0 | 6 | 2 | 3 | 1 |
| Fibrosarcoma | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Malignant schwannoma | | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lipoma | | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| Hemangiosarcoma | | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Osteosarcoma | | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Testis** | (Examined) | 50 | NA | 50 | NA | 50 | NA | 49 | NA |
| Adenoma: interstitial cell | | 1 | | 3 | | 5 | | 0 | |
| **Thorax** | (Examined) | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Mesothelioma (M) | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **Thymus** | (Examined) | 46 | 47 | 48 | 49 | 47 | 49 | 46 | 49 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Carcinoma: metastasis | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Benign thymoma | | 2 | 3 | 3 | 6 | 1 | 5 | 1 | 6 |
| Malignant thymoma | | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| **Thyroid** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Adenoma: C-cell | | 7 | 6 | 9 | 5 | 8 | 4 | 7 | 7 |
| Adenoma: follicular cell | | 5 | 1 [b] | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 4 |
| Carcinoma: C-cell | | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| Carcinoma: follicular cell | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

## 2.6.7.10 E がん原性試験（続き）

Report title: AHU377: 104-week oral (gavage) carcinogenicity study in rats Study no. 0870373

| Daily dose (mg/kg): | | 0 (Control – Group 1) | | 50 (Group 2) | | 150 (Group 3) | | 400 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number evaluated: | | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 | M: 50 | F: 50 |
| **Tongue** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Hemangiosarcoma | | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Trachea** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 |
| Sarcoma: metastasis | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Urinary Bladder** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 49 | 50 | 50 | 49 | 49 |
| Carcinoma: transitional cell | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| **Uterus** | (Examined) | NA | 50 | NA | 49 | NA | 50 | NA | 49 |
| Polyp: endometrial stromal | | | 1 | | 9[d] | | 6 | | 5 |
| Sarcoma: endometrial stromal | | | 0 | | 2 | | 0 | | 0 |
| Adenoma: endometrial | | | 0 | | 0 | | 1 | | 1 |
| Adenocarcinoma: endometrial | | | 0 | | 2 | | 2 | | 1 |
| Malignant: schwannoma | | | 1 | | 0 | | 2 | | 0 |
| Hemangiosarcoma | | | 0 | | 0 | | 1 | | 0 |
| **Whole body** | (Examined) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Hemangioma /hemangiosarcoma | | 3 | 0 | 6 | 1 | 10 [e] | 1 | 4 | 3 |
| Histopathology – Non-neoplastic lesions | | - | - | - | - | - | - | - | - |

1 = at 6 months. For controls, group means are shown. .

- = no noteworthy findings; NA = Not applicable

Trend test p-values: a=0.0046**, b=0.0248*

Pairwise comparison p-values: c=0.0153[#], d=0.0077[##], e=0.0085[##]

Trend test :*=Significant for rare tumors (p≤0.025), **=Significant for common and rare tumors (p≤0.005)
Pairwise comparisons: # = Significant for rare tumors (p≤0.05), ## = Significant for common and rare tumors (p≤0.01).

## 2.6.7.11 生殖発生毒性試験

## 2.6.7.11 A 生殖発生毒性試験

### Non-pivotal studies (LCZ696)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rabbit/ NZW | Oral (gavage), 0.5% CMC / suspensions | G7-G20 [b] | 0, 1, 3, 10, 30, 100 | F: 3 or 6 | Maternal: 30<br>Embryo-fetus: 3 | ≥10 mg/kg: full litter resorptions, ↑pre-and post-implantation losses, ↑total resorptions, ↓viable fetuses | [0670279] | 4.2.3.5.2-2 |

NZW = New Zealand White; CMC = sodium carboxy methylcellulose

a = no observed adverse-effect level
b = G: gestation day

## 2.6.7.11 B　生殖発生毒性試験

### Non-pivotal studies (AHU377)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | NOEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rabbit/ NZW | Oral (gavage), 05% CMC / suspensions | G7-20 [b] | 0, 10, 50, 100, 200 | F: 3 | 200 | There were no test article-related effects noted on any parameters (mortality, clinical signs, body weight, food consumption, reproductive, and external fetal observations) evaluated in this study.<br>Due to formulation and dose volume limitations, sufficiently higher doses could not be administered and the study was terminated. | [0570143] | 4.2.3.5.2-5 |
| Rabbit/ NZW | Oral (gavage), 50 mM phosphate buffer adjusted to pH 8.8 ± 0.1 / suspensions | G7-20 [b] | 0, 200, 500, 1000 | F: 3,<br>F: 6 (high dose) | Maternal: <200,<br>Embryo-fetus: 200 | Mortality/moribundity was observed in 5 of 6 animals at 1000 mg/kg/day. The remaining animal was sacrificed and the group terminated on gestation day 12.<br>Decreased body weight gains, food consumption and clinical signs were noted at all doses.<br>Fetal weights were decreased at 500 mg/kg/day. At 200 mg/kg/day, fetal weights were comparable to controls.<br>There were no gross necropsy findings, effects on reproductive parameters, or fetal external examinations noted at doses ≤ 500 mg/kg/day. | [0570339] | 4.2.3.5.2-6 |

NZW = New Zealand White; CMC = sodium carboxy methylcellulose

a = no observed effect level

b = G: gestation day

## 2.6.7.12　生殖発生毒性試験

## 2.6.7.12 A　生殖発生毒性試験

Report title: LCZ696: An oral (gavage) fertility and early embryonic development study in rats
Study no. [0970613]

Fertility and early embryonic development to implantation

Species/strain: Rat/Wistar Hannover, Crl:WI(Han)

Initial age: At least 10 weeks (at start of dosing)

Date of first dose: M:[redacted] F:[redacted]

Method of administration: Orally via gavage

Day of C-section:[redacted]

Special features: none

Duration of dosing:

M: Once daily for at least 28 days prior to mating, during the 2-week mating period and until terminal necropsy.

F: Once daily for the two week premating period during mating and through gestation day 6.

Location in CTD: 4.2.3.5.1-1

GLP compliance: Yes

Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution/ suspension

No observed adverse effect level: $F_0$ males: 50 mg/kg/day; $F_0$ females: 50 mg/kg/day; $F_0$ fertility and $F_1$ litters: 150 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 10 (Group 2) | 50 (Group 3) | 150 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Males | No. evaluated | 25 | 25 | 25 | 25 |
| | No. died or sacrificed moribund | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | Clinical observations | - | - | - | - |
| | Necropsy observations | - | - | - | - |
| | Body weight (%[a]) | 455 g | -1.8 | -4.2 | -6.4** |
| | Food consumption (%[a]) | 26 g/day | ±0 | -3.8 | -3.8 |
| | Mean no. days prior to mating | 2.5 | 3.0 | 3.4 | 2.3 |
| | No. of males that mated | 21 | 24 | 24 | 19 |
| | Epididymal weight (g) | 1.640 | 1.704 | 1.651 | 1.661 |
| | Testes weight (g) | 4.017 | 4.016 | 3.901 | 4.013 |
| | % Motile sperm | 79 | 78.5 | 79.2 | 72.8 |
| | Sperm count/gram Testes ($\times 10^6$/g) | 123.9 | 114.0 | 114.2 | 108.0 |

## 2.6.7.12 A 生殖発生毒性試験（続き）

Report title: LCZ696: An oral (gavage) fertility and early embryonic development study in rats Study no. 0970613

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 10 (Group 2) | 50 (Group 3) | 150 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Females | No. evaluated | 25 | 25 | 25 | 25 |
| | No. died or sacrificed moribund | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Clinical observations | - | - | - | - |
| | Necropsy observations | - | - | - | - |
| | Premating body weight (%[b]) (Day 15) | 226 g | +0.9 | +1.3 | +0.9 |
| | Gestation body weight (%[b]) | 283 g | +1.1 | +1.1 | -1.4 |
| | Premating food consumption (%[b]) | 18 g/day | ±0 | +5.6 | -5.6 |
| | Gestation food consumption (%[b]) | 25 g/day | +4 | ±0 | +4 |
| | Mean no. days prior to mating | 2.5 | 3.0 | 3.4 | 2.3 |
| | No. of pregnant females | 21 | 24 | 24 | 19 |
| | No. aborted or with total resorption of litter | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean no. corpora lutea | 12.2 | 13.1 | 13.6[#] | 13.3 |
| | Mean no. implantations | 10.3 | 11.9 | 11.9 | 11.8 |
| | Mean % preimplantation loss | 15.6 | 9.5 | 12.5 | 10.7 |
| | Mean no. live conceptuses | 9.9 | 11.3 | 11.1 | 10.9 |
| | Mean no. resorptions | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 0.9 |
| | No. dead conceptuses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean % postimplantation loss | 4.4 | 4.9 | 7.0 | 8.0 |

- = No noteworthy findings; ** $p<0.01$ (Duncan's Multiple Range Test), # $p<0.05$ (Fisher's Exact Test),
a = After 4 weeks of dosing. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

b = At the end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

## 2.6.7.12 B 生殖発生毒性試験

Report title: AHU377 An Oral (gavage) Fertility and Early Embryonic Development Study in the Rat

Study no. [1370483]

Fertility and early embryonic development to implantation

Species/strain: Rat/Wistar Hannover, Crl:WI(Han)

Initial age: M: 12 weeks, F: 9 weeks (at start of dosing)

Date of first dose: M: [redacted]
F: [redacted]

Duration of dosing:

M: Once daily for at least 28 days prior to mating, during the 2-week mating period and until terminal necropsy.

F: Once daily for the two week premating period during mating and through gestation day 6.

Location in CTD: 4.2.3.5.1-2

GLP compliance: Yes

Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose, grade HF, aqueous solution/ suspension

Method of administration: Orally via gavage

Day of C-section: day 13 pc

Special features: none

No observed adverse effect level: $F_0$ males: 250 mg/kg/day; $F_0$ females: 750 mg/kg/day; $F_0$ fertility and $F_1$ litters: 750 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | | 0 (Control) | 75 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Males | No. evaluated | | 24 | 24 | 24 | 24 |
| | No. died or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Clinical observations: Salivation / Fur wet/lower jaw | | - | + | ++ | ++ |
| | Necropsy observations | | - | - | - | - |
| | Body weight (%[a]) | Day 28 | 394.0 g | -0.5 | -1.8 | -5.8 C |
| | | Day 60 | 428.3 g | -0.3 | -1.8 | -5.8 C |
| | Food consumption (%[a]) days 1-28 total | | 608.8 g | -0.6 | -4.8 | -7.9 |
| | Mean no. days prior to mating | | 2.7 | 2.3 | 2.6 | 2.8 |
| | No. of males that mated | | 24 | 24 | 24 | 24 |
| | Epididymal weight (g) total (right and left) | | 1.31 | 1.34 | 1.35 | 1.34 |
| | Testes weight (g) total (right and left) | | 3.73 | 3.79 | 3.83 | 3.86 |
| | % Motile sperm | | 84.6 | 88.3 | 90.0 | 89.6 |
| | Sperm count/gram (millions) | | 813.1 | 792.0 | 714.8 | 860.9 |

## 2.6.7.12 B　生殖発生毒性試験（続き）

Report title: AHU377 An Oral (gavage) Fertility and Early Embryonic Development Study in the Rat　Study no. 1370483

| Daily dose (mg/kg) | | | 0 (Control) | 75 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Females | No. evaluated | | 24 | 24 | 24 | 24 |
| | No. died or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Clinical observations- Salivation/Fur wet/lower jaw | | - | - | ++ | ++ |
| | Necropsy observations | | - | - | - | - |
| | Premating body weight (%[a]) | Day 14 | 209.6 g | -2.0 | -1.7 | -0.7 |
| | Gestation body weight (%[a]) | Day 13 pc | 258.3 g | -1.6 | -1.9 | -1.9 |
| | Premating food consumption (%[a]) | Days 1-14 total | 209.5 g | -4.0 | -3.0 | -2.4 |
| | Gestation food consumption (%[a]) | Days 0-13 pc total | 247.6 g | -0.8 | -2.0 | 0.8 |
| | No. of estrous cycles seen | | 3.5 | 3.4 | 3.3 | 3.4 |
| | Mean no. days prior to mating | | 2.7 | 2.3 | 2.6 | 2.8 |
| | No. of pregnant females | | 23 | 24 | 24 | 24 |
| | No. aborted or with total resorption of litter | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean no. corpora lutea | | 13.6 | 13.7 | 11.5 | 12.5 |
| | Mean no. implantations | | 12.9 | 12.2 | 10.1 | 11.2 |
| | Mean % preimplantation loss | | 5.2 | 11.7 D | 16.2 | 13.9 |
| | Mean no. live conceptuses | | 12.4 | 11.2 | 9.5 | 10.7 |
| | Mean no. resorptions | | 0.5 | 1.0 | 0.7 | 0.5 |
| | No. dead conceptuses | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean % post implantation loss | | 3.8 | 9.5 | 6.6 | 7.7 |

- No noteworthy findings; pc = post coitum; + = Slight ++ = Moderate
C: $P \leq 0.001$ (Dunnett's test); D: $P \leq 0.05$ (Dunn's test)
a = For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

## 2.6.7.13　生殖発生毒性試験

## 2.6.7.13 A　生殖発生毒性試験

Report title: LCZ696: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rats　　Study no.: [0670390]

Effect on embryo-fetal development

Species/strain: Rats / Crl:WI (Glx/BRL/Han)IGS BR　　Duration of dosing: G6-G17　　Location in CTD: 4.2.3.5.2-1

Initial age: Approximately 10 weeks (at arrival)　　Day of C-section: G21　　GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]　　Method of administration: Oral gavage　　Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution / suspensions

Special features: Satellite animals (5 per treatment group, 3 in control group) were included for toxicokinetic analyses. Plasma samples were obtained from animals on G17 at 0.5, 2, 6, and 24 hours post-dose.

No observed adverse effect level:　　$F_0$ females: 200 mg/kg　　$F_1$ litters: 30 mg/kg

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 30 (Group 2) | 100 (Group 3) | 200 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Dams/does | **Toxicokinetics: AHU377** | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | NC | 509 | 821 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | NA | 157 | 214 |
| | **Toxicokinetics: LBQ657** | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | 5950 | 19200 | 29400 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | 1970 | 3290 | 5200 |
| | **Toxicokinetics: Valsartan** | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | 13400 | 60000 | 119000 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | 3020 | 7770 | 12100 |

## 2.6.7.13 A 生殖発生毒性試験（続き）

Report title: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rats Study no.: 0670390

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 30 (Group 2) | 100 (Group 3) | 200 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Dams/does | No. pregnant | 22 | 23 | 22 | 23 |
| | No. died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. aborted or with total resorption of litter | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | No. with premature birth | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | Clinical observations (frequency/animals): | | | | |
| | Decreased stool | 0/0 | 6/3 | 13/7 | 22/10 |
| | Necropsy observations | - | - | - | - |
| | Body weight (%[a]) | 280 g | -2.9 | -2.9 | -5.7* |
| | Food consumption (%[a]) | 82 g | -6.1 | -7.3 | -13.4** |
| | Mean no. corpora lutea | 10.7 | 11.9 | 11.4 | 11.3 |
| | Mean no. implantations | 9.4 | 9.8 | 10.2 | 9.6 |
| | Mean % preimplantation loss | 12.7 | 17.2 | 10.0 | 15.3 |
| Litters | No. litters evaluated | 22 | 22 | 21 | 23 |
| | No. live fetuses | 196 | 207 | 206 | 201 |
| | Mean no. resorptions | 0.5 | 0.4 | 0.9 | 0.9 |
| | No. of litters with dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean % postimplantation loss | 4.9 | 4.2 | 8.4 | 9.0 |
| | Mean fetal body weight (g) | 5.3 | 5.3 | 5.5 | 5.3 |
| | Fetal sex ratios (% males) | 50.5 | 53.1 | 50.5 | 51.7 |
| | Fetal malformations: | | | | |
| | Gross external malformations | - | - | - | - |
| | Visceral malformations | - | - | - | - |
| | Skeletal malformations | - | - | - | - |
| | Total affected fetuses (litters) | 2 (2) | 3 (3) | 3 (2) | 0 (0) |

## 2.6.7.13 A　生殖発生毒性試験（続き）

Report title: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rats　Study no.: 0670390

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | 30 (Group 2) | 100 (Group 3) | 200 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|
| Fetal variations: | | | | |
| Gross external variations | - | - | - | - |
| Visceral variations | - | - | - | - |
| Skeletal variations | - | - | - | - |
| Total affected fetuses (litters) | 60 (20) | 61 (20) | 57 (21) | 55 (21) |

- = No noteworthy findings; G = Gestation day; NC = Not calculated; NA = Not applicable

a = At the end of the dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Dunnett's t-Test)

## 2.6.7.13 B 生殖発生毒性試験

Report title: LCZ696: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rabbits | Study no.: [0670280]

Effect on embryo-fetal development

Species/strain: Rabbit/New Zealand White, Hra:(NZW)SPF | Duration of dosing: G7 - G20 | Location in CTD: 4.2.3.5.2-3

Initial age: At least 22 weeks (at start of dosing) | Day of C-section: G29 | GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] | Method of administration: Oral gavage | Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7HF, aqueous solution / suspensions

Special features: Satellite animals (5 per treatment group, 3 for controls) were used for toxicokinetic sampling. Maternal blood samples were obtained on G20 at 1, 3, 7, and 24 hours post-dose, and live fetuses were collected on G21 for toxicokinetic analyses.

No observed adverse effect level: $F_0$ females: 3 mg/kg; $F_1$ litters: 3 mg/kg

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 3 (Group 2) | 10 (Group 3) | 30 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Dams/does | **Toxicokinetics: AHU377** | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | 52.9 | 303 | 878 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | 15.0 | 56.2 | 143 |
| | **Toxicokinetics: LBQ657** | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | 1930 | 8920 | 102000 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | 491 | 1810 | 10500 |
| | **Toxicokinetics: Valsartan** | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | 41100 | 169000 | 400000 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | 2850 | 10200 | 20100 |

## 2.6.7.13 B　生殖発生毒性試験（続き）

Report title: LCZ696: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rabbits Study no. 0670280

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 3 (Group 2) | 10 (Group 3) | 30 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Dams/does | No. pregnant | 19 | 20 | 20 | 18 |
| | No. died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 1 | 4 |
| | No. aborted or with total resorption of litter | 0 | 0 | 2 | 1 |
| | No. with premature birth | 0 | 0 | 0 | 5 |
| | Clinical observations (frequency/animals): | | | | |
| | Decrease locomotor activity | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 3/2 |
| | Soft stool | 0/0 | 8/4 | 4/3 | 7/3 |
| | Decreased stool | 6/4 | 19/9 | 44/11 | 94/14 |
| | Red stains in pan | 0/0 | 4/3 | 3/2 | 25/12 |
| | Necropsy observations | | | | |
| | Enlarged gall bladders | 0 | 0 | 1 | 7** |
| | Gas/fluid-filled intestines | 0 | 0 | 1 | 5* |
| | Body weight (%[a]) | 3599 g | -0.4 | -2.2 | -5.9 |
| | Food consumption (%[a]) | 167 g | -3.0 | -7.2 | -41.9** |
| | Gravid uterus weight (%) | 529.2 g | -6.0 | -5.7 | -24.5** |
| | Mean no. corpora lutea | 9.9 | 9.2 | 10.2 | 8.8 |
| | Mean no. implantations | 9.1 | 8.3 | 9.3 | 7.4 |
| | Mean % preimplantation loss | 9.0 | 10.3 | 8.7 | 15.7 |
| Litters | No. litters evaluated | 19 | 20 | 18 | 8 |
| | No. live fetuses | 167 | 160 | 141[##] | 34[##] |
| | Mean no. resorptions | 0.3 | 0.3 | 1.5 | 3.1[##] |
| | No. late resorptions | 4 | 3 | 22[##] | 24[##] |
| | No. of litters with dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean % postimplantation loss | 2.9 | 3.0 | 16.1 | 42.4 |

## 2.6.7.13 B　生殖発生毒性試験（続き）

Report title: LCZ696: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rabbits Study no. 0670280

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 3 (Group 2) | 10 (Group 3) | 30 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Litters | Mean fetal body weight (g) | 41.7 | 42.5 | 41.3 | 45.9# |
| (cont.) | Fetal sex ratios (% males) | 55.1 | 50.6 | 52.9 | 55.9 |
| | Fetal malformations: | | | | |
| | Gross external malformations | - | - | - | - |
| | Visceral malformations (litters) | | | | |
| | Hydrocephaly | 0 (0) | 0 (0) | 1 (1) | 3## (2) |
| | Fluid-filled abdomen | 0 (0) | 3 (3) | 0 (0) | 2# (1) |
| | Skeletal malformations | - | - | - | - |
| | Total affected fetuses (litters) | 0 (0) | 1 (1) | 1 (1) | 0 (0) |
| | Fetal variations: | | | | |
| | Gross external variations | - | - | - | - |
| | Visceral variations | - | - | - | - |
| | Skeletal variations | - | - | - | - |
| | Total affected fetuses (litters) | 144 (19) | 138 (20) | 121 (18) | 29 (7) |
| | Toxicokinetics: Fetal tissue concentration (ng/g) | | | | |
| | LBQ657 | NA | 1.35 | 3.68 | 25.3 |
| | Valsartan | NA | 8.54 | 30.7 | 130 |

- = No noteworthy findings; G = Gestation day; NC = Not calculated; NA = Not applicable

a = At the end of the dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

** p<0.01(Dunnett's T-test); # p<0.05, ## p<0.01 (Fisher's Exact Test)

## 2.6.7.13 C　生殖発生毒性試験

Report title: AHU377: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rats　Study no.: [0570301]

Effect on embryo-fetal development

Species/strain: Rat/ Crl: WI(Glx/BRL/Han)IGS BR　Duration of dosing: G6 to 17　Location in CTD: 4.2.3.5.2-4

Initial age: at least 10 weeks (at arrival)　Day of C-section: G21　GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]20[redacted]　Method of administration: oral (gavage)　Vehicle/formulation: 50 mM phosphate buffer, pH □8.8/ suspensions

Special features: Satellite animals (5 per treatment group, 3 for controls) were used for toxicokinetic sampling. Maternal blood samples were obtained on G17 at 0.5, 1, 2 and 24 hours post-dose.

No observed adverse effect level: $F_0$ females: 250 mg/kg/day, $F_1$ litters: at least 750 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | | 0 (Control - Group 1) | 75 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dams/does | Toxicokinetics: | | | | | |
| | AHU377 | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | 2460 | 56800 | 38000 |
| | | Cmax (ng/mL) | NA | 289 | 6600 | 24600 |
| | LBQ657 | AUC0-24h (ng·h/mL) | NC | 60300 | 58700 | 659000 |
| | | Cmax (ng/mL) | NA | 10500 | 13400 | 67000 |
| | No. pregnant | | 24 | 25 | 23 | 25 |
| | No. died or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 1[a] | 0 |
| | No. aborted or with total resorption of litter | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Clinical observations (frequency/animals): | | | | | |
| | Rales | | 0/0 | 1/1 | 5/3 | 19/8 |
| | Salivation | | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 10/6 |
| | Necropsy observations | | - | - | - | - |
| | Body weight (%[b]) | | 280 g | ±0 | -3.9 | -5* |
| | Food consumption (%[b]) | | 81 g | ±0 | -1.2 | -8.6* |
| | Mean no. corpora lutea | | 11.3 | 11.6 | 11.1 | 11.1 |
| | Mean no. implantations | | 9.5 | 10.1 | 8.7 | 9.6 |
| | Mean % preimplantation loss | | 16.5 | 12.6 | 21.8 | 13.2 |

## 2.6.7.13 C　生殖発生毒性試験（続き）

Report title: AHU377: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rats　　Study no.: 0570301

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control - Group 1) | 75 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Litters | No. litters evaluated | 23 | 24 | 21 | 24 |
| | Mean no. live fetuses | 8.9 | 9.5 | 8.0 | 8.9 |
| | Mean no. resorptions | 0.6 | 0.6 | 0.7 | 0.7 |
| | No. of litters with dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean % postimplantation loss | 6.4 | 5.8 | 8.2 | 7.4 |
| | Mean fetal body weight (g) | 5.3 | 5.2 | 5.3 | 5.3 |
| | Fetal sex ratios (% males) | 51.0 | 49.3 | 51.8 | 56.1 |
| | Fetal malformations: | | | | |
| | Gross external malformations | - | - | - | - |
| | Total external malformation (litters) | 0 (0) | 2 (2) | 1 (1) | 2 (1) |
| | Visceral malformations | - | - | - | - |
| | Skeletal malformations | - | - | - | - |
| | Total skeletal malformation (litters) | 4 (4) | 6 (5) | 5 (4) | 4 (3) |
| | Fetal variations: | | | | |
| | Gross external variations | - | - | - | - |
| | Visceral variations | - | - | - | - |
| | Skeletal variations | - | - | - | - |
| | Total skeletal variations (litters) | 66 (21) | 72 (23) | 74## (20) | 68 (22) |

- = No noteworthy findings; G = Gestation day; NC = Not calculated; NA = Not applicable
a = accidental death

b = At the end of the dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

* $p<0.05$ (Dunnett's T-test); ## $p<0.01$ (Fisher's Exact Test)

## 2.6.7.13 D　生殖発生毒性試験

Report title: AHU377: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rabbits
Study no.: [0770644]
Effect on embryo-fetal development
Species/strain: Rabbit/New Zealand White, Hra:(NZW)SPF
Duration of dosing: G7-G20
Location in CTD: 4.2.3.5.2-7
Initial age: At least 22 weeks (at start of dosing)
Day of C-section: G29
GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage
Vehicle/formulation: 50 mM phosphate buffer, pH □8.8/ suspensions

Special features: Toxicokinetic analysis was performed in 3 additional control rabbits and 5 additional rabbits from each treatment group on G20 (1, 3, 7, and 24h post-dosing)
No observed adverse effect level: $F_0$ females: 50 mg/kg, $F_1$ litters: 200 mg/kg

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control-Group 1) | 15 (Group 2) | 50 (Group 3) | 200 (Group 4) | 500 (Group 5) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dams/does | **Toxicokinetics: AHU377** | | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NA | 843 | 2240 | 16400 | 71300 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | 114 | 308 | 2030 | 7860 |
| | **Toxicokinetics: LBQ657** | | | | | |
| | AUC0-24h (ng·h/mL) | NA | 35100 | 129000 | 679000 | 1730000 |
| | Cmax (ng/mL) | NA | 4440 | 15500 | 68200 | 171000 |
| Dams/does | No. pregnant | 20 | 19 | 19 | 19 | 19 |
| | No. died or sacrificed moribund | 1[a] | 0 | 0 | 0 | 3[b] |
| | No. aborted or with total resorption of litter | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | Clinical observations (frequency/animals): | | | | | |
| | Decreased stool | 37/11 | 48/13 | 114/14 | 57/11 | 131/20 |
| | No stool | 2/1 | 0/0 | 1/1 | 9/1 | 22/8 |
| | Soft stool | 10/4 | 4/4 | 11/8 | 6/3 | 3/3 |
| | Red staining in cage pan | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 3/3 |

## 2.6.7.13 D　生殖発生毒性試験（続き）

Report title: AHU377: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rabbits Study no. 0770644

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control-Group 1) | 15 (Group 2) | 50 (Group 3) | 200 (Group 4) | 500 (Group 5) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dams/does | Necropsy observations: | | | | | |
| | Distended stomach | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | Fluid/gas filled intestines | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | Body weight (%[c]) | 3877 g | -4.6 | -5.2 | -6.5* | -11.3** |
| | Food consumption (%[c]) | 152 g | -29.6* | -41.4** | -36.2** | -52.0** |
| | Mean no. corpora lutea | 10.7 | 10.2 | 10.3 | 10.5 | 9.7 |
| | Mean no. implantations | 9.5 | 9.3 | 9.5 | 9.4 | 8.3 |
| | Mean % preimplantation loss | 11.3 | 9.3 | 8.2 | 10.1 | 14.5 |
| Litters | No. litters evaluated | 19 | 19 | 19 | 19 | 14 |
| | No. live fetuses | 170 | 169 | 176 | 171 | 111 |
| | Mean no. resorptions | 0.5 | 0.4 | 0.2 | 0.4 | 0.9 |
| | No. of litters with dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. dead fetuses | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean % postimplantation loss | 5.6 | 4.0 | 2.2 | 4.5 | 10.5 |
| | Mean fetal body weight (g) | 43.3 | 41.2 | 39.6 | 40.0 | 38.5[#] |
| | Fetal sex ratios (% males) | 55.9 | 55.6 | 52.3 | 49.7 | 49.5 |
| | Fetal malformations: | | | | | |
| | Gross external malformations (litters) | | | | | |
| | Curly tail | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (1) |
| | Visceral malformations (litters) | | | | | |
| | Absent gallbladders | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 3 (3) |

## 2.6.7.13 D 生殖発生毒性試験（続き）

Report title: AHU377: An oral (gavage) embryo-fetal development study in rabbits Study no. 0770644

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control-Group 1) | 15 (Group 2) | 50 (Group 3) | 200 (Group 4) | 500 (Group 5) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Litters | Skeletal malformations (litters) | | | | | |
| (cont.) | Misshapen hyoid | 0 (0) | 0 (0) | 1 (1) | 0 (0) | 2 (2) |
| | Fused cervical centrum | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (1) |
| | Misshapen cervical centrum | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (1) |
| | Hemicentric cervical centrum | 0 (0) | 0 (0) | 1 (1) | 0 (0) | 1 (1) |
| | Total affected fetuses | 0 (0) | 2 (2) | 2 (2) | 0 (0) | 4# (4#) |
| | Fetal variations: | | | | | |
| | Gross external variations (litters) | | | | | |
| | Short tail | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (1) |
| | Visceral variations | - | - | - | - | - |
| | Skeletal variations (litters) | | | | | |
| | Incomplete ossification: | | | | | |
| | Hyoid | 21 (10) | 50## (9) | 56## (16) | 34 (11) | 46## (9) |
| | Metacarpal | 19 (7) | 38## (11) | 17 (9) | 44## (12) | 26## (9) |
| | Forepaw phalanx | 24 (8) | 33 (9) | 29 (10) | 26 (13) | 30## (9) |
| | Sternebra | 28 (11) | 41 (13) | 40 (14) | 48# (14) | 34## (12) |
| | Talus | 5 (2) | 14# (4) | 3 (2) | 4 (3) | 4 (3) |
| | Total affected fetuses (litters) | 141 (19) | 144 (19) | 143 (19) | 141 (19) | 106## (14) |

- = No noteworthy findings; G = Gestation day; NC = Not calculated; NA = Not applicable

a = treatment-unrelated

b = two rabbits were moribund sacrificed on gestation day 24, and one on gestation day 26

c = At the end of the dosing period (*i.e.,* Day 21). For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent differences).

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Dunnett's T-test); # $p<0.05$, ## $p<0.01$ (Fisher's Exact Test),

## 2.6.7.14　生殖発生毒性試験

## 2.6.7.14 A　生殖発生毒性試験

Report title: AHU377: An oral (gavage) pre and postnatal study in rats
Effect on pre and post-natal development

Study no.: [1070349 ]

Species/strain: Rat/ Wistar Hannover [Crl:WI (Han)]
Initial age: 11 to 12 weeks (at start of treatment)
Date of first dose: [redacted]

Duration of dosing: G7 to Day 20 or 22 pp
Day of $F_1$ generation C-section: G13
Method of administration: oral gavage

Location in CTD: 4.2.3.5.3-1
GLP compliance: Yes
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution / suspensions

Special features: None
No observed adverse effect level: $F_0$ generation: 750 mg/kg/day, $F_1$ generation: 250 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| $F_0$ females | No. pregnant | 23 | 20 | 24 | 23 |
| | No. died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | No. aborted or with total resorption of litter | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Clinical observations | - | - | - | - |
| | Necropsy observations: | - | - | - | - |
| | Gestation Body weight | - | - | - | - |
| | Lactation Body weight | - | - | - | - |
| | Gestation Food consumption | - | - | - | - |
| | Lactation Food consumption | - | - | - | - |
| | Mean duration of gestation (days) | 21.3 | 21.2 | 21.4 | 21.4 |
| | No. dams with abnormal parturition | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Gestation index (%) | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

## 2.6.7.14 A 生殖発生毒性試験（続き）

Report title: AHU377: An oral (gavage) pre and postnatal study in rats Study no.: 1070349

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|
| $F_1$ Litters (preweaning) | | | | |
| No. litters evaluated | 23 | 20 | 24 | 23 |
| Mean no. implantation sites | 8.8 | 10.0 | 9.6 | 9.5 |
| No. live pups/litter | 8.4 | 9.3 | 9.0 | 9.1 |
| No. of litters with dead pups | 0 | 2 | 0 | 0 |
| No. dead pups/litter | 0 | 0.2 | 0 | 0 |
| Pup sex ratios (% males) | 52.7 | 51.0 | 47.7 | 43.6 |
| Post natal survival- days 0 to 4 pp (%) | 97.8 | 99.5 | 99.1 | 98.9 |
| Post natal survival- days 4 to 21 pp (%) | 100.0 | 100.0 | 99.2 | 100.0 |
| No. of total litter loses | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pup body weights at birth (g) | 5.98 | 5.82 | 6.03 | 5.89 |
| Pup body weights day 21 pp (g) | 46.1 | 44.5 | 45.7 | 43.0 |
| Physical development | - | - | - | - |
| Reflexological development | - | - | - | - |
| Clinical observations | - | - | - | - |
| Necropsy observations | - | - | - | - |
| $F_1$ males (post weaning) | | | | |
| No. evaluated | 23 | 20 | 24 | 23 |
| No. died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Clinical observations | - | - | - | - |
| Body weight gain Day 24 to 108 pp | - | - | - | - |
| Food consumption Day 21 to 77 pp | - | - | - | - |
| Visual function | - | - | - | - |
| Necropsy observations | - | - | - | - |
| Preputial separation (days of development) | 42.8 | 42.5 | 42.0 | 43.0 |
| Behavioral performance | - | - | - | - |

## 2.6.7.14 A 生殖発生毒性試験（続き）

Report title: AHU377: An oral (gavage) pre and postnatal study in rats Study no.: 1070349

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|
| $F_1$ mating (with $F_1$ females): | | | | |
| No. males cohabited | 22 | 20 | 24 | 23 |
| Mating index (%) | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 91.3 |
| No. fertile males | 22 | 19 | 22 | 20 |
| $F_1$ females (post weaning) | | | | |
| No. evaluated | 22 | 20 | 24 | 23 |
| No. died or sacrificed moribund | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Clinical observations | - | - | - | - |
| Body weight gain Day 24 to 80 pp | - | - | - | - |
| Body weight gain G0 to G13 | - | - | - | - |
| Food consumption Day 21 to 77 pp | - | - | - | - |
| Food consumption G0 to G13 | - | - | - | - |
| Visual function | - | - | - | - |
| Necropsy observations: | - | - | - | - |
| Vaginal opening (days of development) | 32.1 | 31.3 | 30.8 | 31.5 |
| Behavioral performance | - | - | - | - |

## 2.6.7.14 A 生殖発生毒性試験（続き）

Report title: AHU377: An oral (gavage) pre and postnatal study in rats Study no.: 1070349

| Daily dose (mg/kg) | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) | 250 (Group 3) | 750 (Group 4) |
|---|---|---|---|---|
| $F_1$ mating (with $F_1$ males): | | | | |
| No. females cohabited | 22 | 20 | 24 | 23 |
| No. pregnant females | 22 | 19 | 22 | 20 |
| Mean no. corpora lutea | 11.8 | 13.4 | 12.7 | 12.8 |
| Mean no. implantation sites | 10.6 | 12.2 | 12.0 | 12.0 |
| Mean pre implantation loss (%) | 11.1 | 7.9 | 5.7 | 6.1 |
| Mean no. live embryos | 10.2 | 11.4 | 11.6 | 11.5 |
| Mean no. resorptions | 0.4 | 0.8 | 0.4 | 0.4 |
| No. of litters with dead embryos | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mean post implantation loss (%) | 3.1 | 6.0 | 3.3 | 3.7 |

- = No noteworthy findings; G = gestation day; pp = post partum

## 2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

## 2.6.7.15 A 幼若ラットを用いた用量設定試験

### Non-pivotal studies (AHU377)

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg/day) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat/ Han Wistar | Oral (gavage); 0.5% HPC (Klucel) / suspensions | 4 weeks Day 7 to 34 pp | 0, 100, 400, 800 | M:12, F:12 | 100 | Mortality/moribundity: control: 1 pup, 400 mg/kg/day: 4 pups, 800 mg/kg/day: 8 pups. Before death, some animals showed signs of abnormal respiration; some also had lower body weight gains or losses. The gross pathological examination revealed findings suggestive of gavage accidents that were observed in the majority of these animals at 400 and 800 mg/kg/day.<br>≥400 mg/kg: ↓body weight gain<br>There were no test article-related gross macroscopic changes on day 35 *post partum*. | [0870735] | 4.2.3.5.4-1 |

a = no observed adverse-effects level; pp: post-partum; HPC = hydroxypropylcellulose

## 2.6.7.15 B　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（AHU377）

Report title: AHU377: An oral (gavage) toxicity study in the juvenile rats
Study no.: [0870734]
Species/strain: Rats / Crl:WI (Han)
Duration of dosing: 64 days from Day 7 to 70 pp
Location in CTD: 4.2.3.5.4-2
Initial age: Day 7 pp (at start of dosing)
Duration of postdose: 4-9 weeks (depending on subset)
GLP compliant: yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage once daily
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution/ suspensions

Special features: Assessments of physical development (eye opening, vaginal opening, preputial separation), sensory development (auricular startle, visual function), behavioral performance (motor activity, water maze), reproductive phase (mating, gestation day 13 uterine examination), hematology, biochemistry, urinalysis, toxicokinetics, peripheral quantitative computed tomography, radiographs, organ weights, gross and histopathological evaluations.

No-Observed-Adverse-Effect Level: 100 mg/kg/day

| Dose level (mg/kg/day) | | 0 (Control; Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M: 52 [a] | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| **Toxicokinetic: AHU377** | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 7 pp | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| (ng•h/mL) | Day 64 pp | - | - | 874 | 402 | 4590 | 5360 | 16300 | 12100 |
| Cmax | Day 7 pp | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| (ng/mL) | Day 64 pp | - | - | 252 | 226 | 610 | 1010 | 5440 | 1340 |
| **Toxicokinetic: LBQ657** | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 7 pp | - | - | 435000 | 309000 | 1780000 | 1990000 | 3240000 | 3200000 |
| (ng•h/mL) | Day 64 pp | - | - | 46600 | 37300 | 157000 | 207000 | 465000 | 802000 |
| Cmax | Day 7 pp | - | - | 51000 | 43900 | 145000 | 202000 | 248000 | 213000 |
| (ng/mL) | Day 64 pp | - | - | 10400 | 12200 | 19300 | 27000 | 75000 | 77500 |
| **Mortality** | | There was no treatment related mortality during the course of this study. | | | | | | | |
| Preweaning – Died, missing or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| Post weaning – Died, missing or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

## 2.6.7.15 B　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（AHU377）

Report title: AHU377: An oral (gavage) toxicity study in the juvenile rats　Study no.: 0870734

| Dose level (mg/kg/day) | 0 (Control; Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| **Clinical signs incidence** | | | | | | | | |
| Abdominal firm internal structure | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 20 | 27 |
| Salivation | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 19 | 15 |
| Wet fur (lower jaw) | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 13 | 16 | 15 |
| **Body weight** (% [b]) | | | | | | | | |
| Day 8 pp | 16.97 g | 16.63 g | -3.8 | -2.1 | -8.1*** | -9.9### | -12.6*** | -13.2### |
| Day 21 pp | 48.02 g | 46.78 g | ±0 | +1.9 | -1.0 | -2.5 | -8.9*** | -10.7### |
| Day 70 pp reproductive subset | 335.0 g | 200.8 g | -5.9 | +2.3 | -3.0 | +0.7 | -4.7 | +0.5 |
| Day 70 pp recovery subset | 329.9 g | 199.6 g | -4.9 | -2.6 | -1.9 | -1.4 | -1.5 | -1.3 |
| Day 70 pp pathology subset | 322.4 g | 209.8 g | -2.3 | -3.5 | +4.0 | -5.4 | -8.2 | -1.9 |
| Day 133 pp (Males) Day 101 pp (females) - reproductive subset | 450.3 g | 228.9 g | -4.4 | +4.8 | -0.3 | +3.7 | +1.3 | +4.8 |
| Day 112 pp – recovery subset | 418.8 g | 234.5 g | -4.0 | -2.4 | +0.4 | +0.8 | +2.5 | +0.1 |
| **Overall food consumption** (% [b]) | | | | | | | | |
| Day 28 to 70 pp reproductive subset | 1031 g | 771 g | -4.1 | +4.4 | +2.9 | +2.5 | +2.8 | +8.5** |
| Day 28 to 70 pp recovery subset | 1042 g | 768 g | -3.6 | -3.1 | +0.6 | +3.4 | +2.7 | +4.8 |
| Day 70 to 101 pp reproductive subset | 839 g | 599 g | -4.1 | +3.8 | +1.0 | +1.6 | +5.8 | +7.2 |
| Day 70 to 112 pp recovery subset | 1114 g | 768 g | -3.1 | -3.9 | +0.6 | +2.6 | +6.1 | +5.1 |
| ***In vivo* pQCT** (% [b]) | | | | | | | | |
| Right proximal tibia – metaphysis site | | | | | | | | |
| day 28 pp total BMC | 3.82 mg/mm | 3.04 mg/mm | -0.29 | +4.87 | -10.33 | -6.55 | -16.72** | -16.40* |
| total BMD | 381.37 mg/cm$^3$ | 369.64 mg/cm$^3$ | +1.35 | +1.30 | -8.19** | -7.50* | -9.11*** | -10.38*** |
| trabecular BMC | 1.31 mg/mm | 0.94 mg/mm | +0.69 | +6.68 | -11.39 | -8.38 | -20.34* | -18.77* |
| trabecular BMD | 260.52 mg/cm$^3$ | 228.39 mg/cm$^3$ | +2.47 | +3.31 | -9.37 | -8.99 | -13.50** | -12.67* |

## 2.6.7.15 B 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（AHU377）

Report title: AHU377: An oral (gavage) toxicity study in the juvenile rats Study no.: 0870734

| Dose level (mg/kg/day) | | 0 (Control; Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| | cortical/subcortical BMC | 2.50 mg/mm | 2.09 mg/mm | -0.68 | +3.96 | -9.66 | -5.78 | -14.66** | -15.43* |
| | cortical/subcortical BMD | 502.80 mg/cm$^3$ | 511.71 mg/cm$^3$ | +0.76 | +0.23 | -7.55*** | -6.93** | -6.83** | -9.34*** |
| ***In vivo* pQCT** (% [b]) (cont'd) | | | | | | | | | |
| Right proximal tibia – diaphysis site | | | | | | | | | |
| day 28 pp | total area | 2.80 mm$^2$ | 2.56 mm$^2$ | -1.21 | +2.26 | -1.50 | -0.47 | -9.99* | -11.24 |
| | cortical area | 1.61 mm$^2$ | 1.53 mm$^2$ | -3.42 | +4.13 | -5.23 | -2.30 | -8.47 | -8.79* |
| | cortical BMC | 1.41 mg/mm | 1.35 mg/mm | -4.39 | +3.11 | -9.55* | -3.85 | -12.24** | -13.02** |
| | cortical BMD | 881.13 mg/cm$^3$ | 887.48 mg/cm$^3$ | -1.19 | -0.96 | -4.71*** | -1.73 | -4.02** | -4.83*** |
| | periosteal circumference | 5.93 mm | 5.67 mm | -0.61 | +1.05 | -0.71 | -0.14 | -5.13* | -5.96 |
| | endosteal circumference | 3.87 mm | 3.60 mm | +0.67 | -0.50 | +1.81 | +1.39 | -6.29 | -8.67 |
| Right proximal tibia – metaphysis site | | | | | | | | | |
| day 105 pp | trabecular BMC | 2.60 mg/mm | 2.22 mg/mm | -6.36 | -5.90 | -5.63 | -13.50 | -13.22 | -15.84* |
| | trabecular BMD | 291.17 mg/cm$^3$ | 464.04 mg/cm$^3$ | -4.34 | +3.72 | -6.69 | -6.35 | -11.40 | -12.32 |
| **X-ray bone measurement** (% [b]) | | | | | | | | | |
| Appendicular skeleton | | | | | | | | | |
| day 28 pp | right femur length | 21.42 mm | 21.10 mm | -2.05 | -0.86 | -2.33 | -1.59 | -4.37** | -4.37** |
| | right femur width | 2.40 mm | 2.36 mm | +0.04 | -0.17 | -1.17 | -0.80 | -4.38 | -4.02 |
| Axial skeleton | | | | | | | | | |
| day 28 pp | length | 25.08 mm | 24.53 mm | ±0 | -0.07 | -0.49 | -0.49 | -3.01 | -2.63 |
| | width | 4.46 mm | 4.33 mm | -1.16 | -0.05 | +0.18 | -0.65 | -1.10 | -5.22*** |

## 2.6.7.15 B　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（AHU377）

Report title: AHU377: An oral (gavage) toxicity study in the juvenile rats　Study no.: 0870734

| Dose level (mg/kg/day) | | 0 (Control; Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| ***Ex vivo* pQCT** (% [b]) | | | | | | | | | |
| Left tibia – metaphysis site | | | | | | | | | |
| day 71 pp | total BMC | 7.19 mg/mm | 6.15 mg/mm | -1.74 | -8.00 | +1.28 | -9.14* | -12.82** | -11.51** |
| | total BMD | 442.7 mg/cm$^3$ | 580.7 mg/cm$^3$ | -1.19 | -7.63* | -1.91 | -4.94 | -8.16* | -8.34* |
| | trabecular BMC | 1.80 mg/mm | 1.90 mg/mm | +2.09 | -20.75** | +10.34 | -16.79* | -12.94 | -22.73** |
| | trabecular BMD | 198.9 mg/cm$^3$ | 325.6 mg/cm$^3$ | +3.18 | -20.42** | +7.88 | -13.10 | -7.71 | -20.19** |
| | cortical/subcortical BMC | 5.39 mg/mm | 4.26 mg/mm | -3.02 | -2.35 | -1.69 | -5.83 | -12.77*** | -6.57 |
| | cortical/subcortical BMD | 741.3 mg/cm$^3$ | 892.6 mg/cm$^3$ | -2.61 | -1.94 | -5.15 | -1.23 | -8.24** | -2.89 |
| Left tibia – diaphysis site | | | | | | | | | |
| day 71 pp | cortical area | 3.90 mm$^2$ | 3.22 mm$^2$ | -2.75 | -4.22 | -0.92 | -7.17** | -5.70 | -5.36* |
| | cortical BMC | 4.69 mg/mm | 3.86 mg/mm | -3.02 | -5.27* | -2.29 | -8.53*** | -7.82* | -6.22** |
| | cortical BMD | 1201.38 mg/cm$^3$ | 1198.58 mg/cm$^3$ | -0.32 | -1.06 | -1.36 | -1.40 | -2.10* | -0.91 |
| **Clinical pathology** | | | | | | | | | |
| End of treatment | | | | | | | | | |
| Urea (mg/dL) | | 16.72 | 16.57 | 15.50 | 15.78 | 17.25 | 17.35 | 19.48** | 18.96 |
| Phosphorous (mg/dL) | | 7.65 | 7.15 | 9.17*** | 8.18 | 8.69* | 8.09 | 9.10*** | 8.35 |
| End of recovery | | | | | | | | | |
| Glucose (mg/dL) | | 230.5 | 260.8 | 284.5 | 216.5 | 293.6* | 222.9 | 323.6** | 239.4 |
| Triglycerides (mg/dL) | | 100.8 | 69.3 | 101.3 | 50.3 | 126.0 | 54.0 | 156.4 | 49.7 |
| Alanine aminotransferase (U/L) | | 40.0 | 34.1 | 57.9 | 34.9 | 36.0 | 37.8 | 40.2 | 98.4 |
| Aspartate aminotransferase (U/L) | | 97.1 | 76.0 | 129.8 | 79.5 | 83.6 | 93.4 | 85.2 | 232.6 |

## 2.6.7.15 B　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（AHU377）

Report title: AHU377: An oral (gavage) toxicity study in the juvenile rats　Study no.: 0870734

| Dose level (mg/kg/day) | 0 (Control; Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| **Microscopic changes** | | | | | | | | |
| End of treatment | | | | | | | | |
| Stomach (no. examined) | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 | 12 |
| Hyperplasia: squamous mucosa | 0 | 1 | 3 | 4 | 5 | 2 | 5 | 4 |
| Vacuolation: squamous mucosa | 0 | 1 | 1 | 2 | 4 | 1 | 3 | 2 |
| End of recovery | | | | | | | | |
| Stomach (no. examined) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Hyperplasia: squamous mucosa | 2 | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 |

- = No noteworthy findings; pp: post-partum; BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density;

* p≤0.05, ** p≤0.01, *** p≤0.001 (Dunnett); # p≤0.05 , ## p≤0.01, ### p≤0.001 (Dunn)

a = Main study included a reproduction and recovery subset: 20/sex/group were assigned to fertility assessments (reproduction subset) and 20/sex/group were assigned to behavioral and clinical pathology, gross and histopathological assessments (recovery subset).Animals assigned to the pathology subset underwent clinical pathology assessments during the last week of treatment and had gross and histopathological assessments.

b = For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

## 2.6.7.15 C　幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験（AHU377）

Report title: A 4-week oral (gavage) investigative bone study with AHU377 in juvenile rats with a 16-weeks recovery period
Study no.: [1170516]
Species/strain: Wistar-Hannover Rat [Crl:WI(HAN)]
Duration of dosing: 4 Weeks (PND 7-35)
Location in CTD: 4.2.3.5.4-3
Initial age: 7 Days post partum (at start of dosing)
Duration of postdose: 16 Weeks
GLP compliance: yes
Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage
Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution.

Special features: Assessments of serum chemistry, urinalysis, bone biomarkers, toxicokinetics, bone length and density [DXA and peripheral quantitative computed tomography (PQCT), radiographs], biomechanical testing, histomorphometry.
Toxicokinetic analysis based on sparse sampling (2/sex/group per time point)

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | Main | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 |
| | Recovery | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 |
| Toxicokinetics: AHU377 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h: | Day 7 pp | NA | NA | 21400 | 20200 | 83700 | 49200 | 121000 | 137000 |
| (ng·h/mL) | Day 21 pp | NA | NA | 1900 | 1340 | 9010 | 5530 | 14500 | 18800 |
| | Day 34 pp | NA | NA | 751 | 564 | 4350 | 7000 | 7620 | 21400 |
| Cmax: | Day 7 pp | NA | NA | 16900 | 17700 | 22900 | 12100 | 49400 | 36000 |
| (ng/mL) | Day 21 pp | NA | NA | 393 | 292 | 1650 | 918 | 1720 | 2710 |
| | Day 34 pp | NA | NA | 446 | 275 | 1110 | 1470 | 1720 | 2330 |
| Toxicokinetics: LBQ657 | | | | | | | | | |
| AUC0-24h: | Day 7 pp | NA | NA | 203000 | 176000 | 752000 | 700000 | 1350000 | 1400000 |
| (ng·h/mL) | Day 21 pp | NA | NA | 182000 | 117000 | 574000 | 485000 | 813000 | 895000 |
| | Day 34 pp | NA | NA | 47200 | 45500 | 239000 | 369000 | 645000 | 1090000 |
| Cmax: | Day 7 pp | NA | NA | 20700 | 25400 | 60600 | 85300 | 151000 | 95000 |
| (ng/mL) | Day 21 pp | NA | NA | 19700 | 18800 | 61800 | 70300 | 75900 | 140000 |
| | Day 34 pp | NA | NA | 20100 | 21400 | 64300 | 62100 | 186000 | 81200 |

## 2.6.7.15 C　幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験（AHU377）

Report title: A 4-week oral (gavage) investigative bone study with AHU377 in juvenile rats with a 16-weeks recovery period　Study no. 1170516

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | Main | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 |
| | Recovery | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 |
| Mortality:- Died, missing, moribund sacrifice | | There was no treatment related mortality during the course of this study. | | | | | | | |
| Preweaning | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Post weaning | | 1 [c] | 1 [d] | 0 | 0 | 0 | 1 [c] | 0 | 1 [c] |
| Clinical observations [a] | | | | | | | | | |
| Abdominal Distension | | - | - | - | - | - | - | 52 (9) | 88(13) |
| Abdominal Firm Inter Structure | | - | - | - | - | - | - | 26 (5) | 22 (4) |
| Body weight (% [b]) | Day 10pp | 22.25 | 20.93 | -2.2 | -0.9 | -11 B | -6.5 | -19 C | -16 C |
| | Day 13pp | 29.05 | 27.82 | -0.4 | -0.1 | -8 A | -5.7 | -19 C | -16 C |
| | Day 17pp | 37.69 | 35.89 | -0.8 | +0.8 | -4.8 | -2.3 | -16 C | -11 C |
| | Day 20pp | 45.07 | - | -4.7 | - | -1.0 | - | -10B | - |
| Clinical biochemistry (Day 35 pp): | | | | | | | | | |
| ALT (U/L) | | 36.1 | 36.1 | 40.2 | 37.5 | 44.1 A | 37.3 | 45.5 B | 42.4 A |
| Calcium (mg/dL) | | 10.53 | - | 10.76 | - | 10.77 | - | 11.28 B | - |
| Phosphorus (mg/dL) | | 9.69 | - | 11.18 A | - | 10.91 | - | 12.02 C | - |
| Magnesium (mg/dL | | 2.08 | - | 2.24 | - | 2.28 E | - | 2.35 D | - |
| Triglycerides (mg/dL) | | 57.8 | - | 58.3 | - | 74.2 | - | 70.3 | - |
| Urinalysis (Day 35 pp): | | | | | | | | | |
| Calcium fractional excretion (%) | | 1.017 | 1.131 | 1.032 | 1.103 | 0.697 | 0.665 | 0.681 | 0.680 |
| Calcium/Creatinine ratio | | 0.5438 | 0.5794 | 0.5286 | 0.5888 | 0.3670 | 0.3676 | 0.3603 | 0.3459 |
| Bone Length Measurements (mm): | | | | | | | | | |
| Right Femur | Day 21/22pp | 16.251 | 16.384 | 16.237 | 16.096 | 15.843 | 15.898 A | 15.240 C | 15.169 C |
| | Day 33/34pp | 23.995 | 23.677 | 24.013 | 23.228 | 23.680 | 23.163 | 23.283 A | 22.774 B |
| Right Tibia | Day 21/22pp | 21.060 | 21.048 | 21.143 | 20.868 | 20.588 | 20.472 | 19.896 C | 19.689 C |
| | Day 33/34pp | 27.577 | 26.928 | 27.412 | 26.663 | 27.404 | 26.589 | 26.929 B | 26.206 C |

## 2.6.7.15 C　幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験（AHU377）

Report title: A 4-week oral (gavage) investigative bone study with AHU377 in juvenile rats with a 16-weeks recovery period　Study no. 1170516

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | Main | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 |
| | Recovery | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 |
| Bone Densitometry Evaluation (*In vivo*): | | | | | | | | | |
| DXA: | | | | | | | | | |
| Whole Body | | | | | | | | | |
| Area ($mm^2$) | Day 21/22pp | 17.253 | 16.719 | 16.913 | 16.570 | 17.591 | 16.348 | 15.009 C | 15.713 |
| BMC (mg/mm) | Day 21/22pp | 1.309 | 1.273 | 1.267 | 1.235 | 1.293 | 1.203 | 1.085 F | 1.128 A |
| | Day 33/34pp | 3.019 | 2.873 | 31.895 | 2.775 | 2.968 | 2.794 | 2.718 B | 2.641 B |
| BMD ($mg/cm^3$) | Day 21/22pp | 0.0757 | 0.0760 | 0.0748 | 0.0743 | 0.0734 | 0.0735 | 0.0723 A | 0.0718 F |
| | Day 33/34pp | 0.0908 | 0.0912 | 0.0905 | 0.0890 | 0.0883 | 0.0885 A | 0.0847 F | 0.0871 C |
| Lumbar Spine | | | | | | | | | |
| BMC (mg/mm) | Day 21/22pp | 0.021 | 0.018 | 0.021 | 0.019 | 0.018 | 0.018 | 0.014 E | 0.014 |
| | Day 33/34pp | 0.082 | 0.078 | 0.073 | 0.073 | 0.077 | 0.073 | 0.067 B | 0.068 B |
| BMD ($mg/cm^3$) | Day 21/22pp | 0.0310 | 0.0269 | 0.0266 A | 0.0282 | 0.0252 B | 0.0259 | 0.0217 C | 0.0233 |
| | Day 33/34pp | 0.0774 | 0.0713 | 0.0685 A | 0.0712 | 0.0700 A | 0.0684 | 0.0623 C | 0.0685 |
| Right Femur | | | | | | | | | |
| Area ($mm^2$) | Day 21/22pp | 0.358 | 0.381 | 0.377 | 0.365 | 0.343 | 0.354 | 0.338 | 0.328 E |
| BMC (mg/mm) | Day 21/22pp | 0.018 | 0.018 | 0.018 | 0.018 | 0.016 | 0.016 | 0.013 A | 0.013 B |
| | Day 33/34pp | 0.065 | 0.068 | 0.063 | 0.064 | 0.064 | 0.064 | 0.057 | 0.055 C |
| BMD ($mg/cm^3$) | Day 21/22pp | 0.0486 | 0.0472 | 0.0447 | 0.0466 | 0.0447 | 0.0447 | 0.0398 B | 0.0429 |
| | Day 33/34pp | 0.0999 | 0.1074 | 0.0999 | 0.1048 | 0.1013 | 0.1032 | 0.0941 | 0.0982 B |

## 2.6.7.15 C 幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験（AHU377）

Report title: A 4-week oral (gavage) investigative bone study with AHU377 in juvenile rats with a 16-weeks recovery period Study no. 1170516

| Daily dose (mg/kg) | | | 0 (Control – Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | Main | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 |
| | | Recovery | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 |
| pQCT: | | | | | | | | | | |
| Right Tibia Metaphysis | | | | | | | | | | |
| Total | Area ($mm^2$) | Day 21/22pp | 7.061 | 6.708 | 6.509 | 6.508 | 6.748 | 6.318 | 5.874 C | 5.848 C |
| | BMC (mg/mm) | Day 21/22pp | 1.952 | 1.862 | 1.680 | 1.805 | 1.912 | 1.812 | 1.533 B | 1.643 |
| | | Day 33/34pp | 4.402 | 4.123 | 4.042 | 3.773 | 4.198 | 3.816 | 3.816 B | 3.554 E |
| | BMD ($mg/cm^3$) | Day 33/34pp | 383.74 | 394.60 | 369.91 | 381.43 | 361.53 A | 379.80 | 348.05 C | 361.48 C |
| Trabecular | | | | | | | | | | |
| | BMC (mg/mm) | Day 21/22pp | 0.690 | 0.633 | 0.578 | 0.635 | 0.705 | 0.658 | 0.528 A | 0.600 |
| | | Day 33/34pp | 1.745 | 1.624 | 1.520 A | 1.421 | 1.598 | 1.459 | 1.411 B | 1.337 E |
| | BMD ($mg/cm^3$) | Day 33/34pp | 275.55 | 280.88 | 251.87 | 260.38 | 249.37 | 263.43 | 233.44 C | 245.43 B |
| Cortical/Subcortical | | | | | | | | | | |
| | BMC (mg/mm) | Day 21/22pp | 1.261 | 1.230 | 1.103 A | 1.170 | 1.208 | 1.151 | 1.001 C | 1.043 B |
| | | Day 33/34pp | 2.659 | 2.497 | 2.520 | 2.353 | 2.598 | 2.359 | 2.403 B | 2.218 C |
| | BMD ($mg/cm^3$) | Day 33/34pp | 516.25 | 534.28 | 514.98 | 529.76 | 499.40 | 522.51 | 488.86 B | 504.76 B |

## 2.6.7.15 C 幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験（AHU377）

Report title: A 4-week oral (gavage) investigative bone study with AHU377 in juvenile rats with a 16-weeks recovery period Study no. 1170516

| Daily dose (mg/kg) | | | 0 (Control – Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | Main | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 |
| | | Recovery | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 |
| Right Tibia Diaphysis | | | | | | | | | | |
| Total | Area ($mm^2$) | Day 21/22pp | 2.348 | 2.254 | 2.335 | 2.265 | 2.268 | 2.157 | 1.963 C | 1.937 C |
| | | Day 33/34pp | 3.097 | 2.940 | 3.099 | 2.911 | 3.056 | 2.893 | 2.868 | 2.688 A |
| Cortical | Area ($mm^2$) | Day 21/22pp | 1.353 | 1.348 | 1.367 | 1.391 | 1.345 | 1.279 | 1.152 C | 1.206 B |
| | BMC (mg/mm) | Day 21/22pp | 0.814 | 0.813 | 0.826 | 0.842 | 0.806 | 0.770 | 0.663 B | 0.724 A |
| | PERI_C (mm) | Day 21/22pp | 5.4290 | 5.3170 | 5.4116 | 5.3328 | 5.3366 | 5.2023 | 4.9651 C | 4.9301 C |
| | | Day 33/34pp | 6.2354 | 6.0756 | 6.2366 | 6.0457 | 6.1935 | 6.0275 | 6.0003 | 5.8120 A |
| | ENDO_C (mm) | Day 21/22pp | 3.5278 | 3.3663 | 3.4715 | 3.3143 | 3.4008 | 3.3083 | 3.1896 A | 3.0248 B |
| | | Day 33/34pp | 3.8639 | 3.6842 | 3.8805 | 3.6846 | 3.7938 | 3.6105 | 3.6013 | 3.4080 A |
| Biomechanical Testing: | | | | | | | | | | |
| Right Femur (3-point bending) | | | | | | | | | | |
| Stiffness (N/mm) | | Main | 54.83 | 74.95 | 58.75 | 72.64 | 49.74 | 56.97 B | 45.62 | 60.58 A |
| Modulus (MPa) | | Main | 586.93 | 980.72 | 669.33 | 970.11 | 552.26 | 679.58 B | 572.04 | 865.59 |
| AUC (N-mm) | | Main | 56.54 | 44.79 | 50.65 | 49.64 | 51.63 | 47.32 | 46.32 E | 43.52 |
| L4+L5 Vertebral Bodies - Compression | | | | | | | | | | |
| AUC (N-mm) | | Main | 8.19 | 6.80 | 6.70 | 6.08 | 6.25 | 6.81 | 5.46 A | 5.71 |
| Bone Densitometry Evaluation (*Ex vivo*): | | | | | | | | | | |
| DXA | | | | | | | | | | |
| Right Femur | | | | | | | | | | |
| Global | BMC (g) | Main | 0.0830 | 0.0776 | 0.0767 | 0.0749 | 0.0758 | 0.0772 | 0.0711 A | 0.0683 |

## 2.6.7.15 C　幼若ラットを用いた骨への影響に関する探索的試験（AHU377）

Report title: A 4-week oral (gavage) investigative bone study with AHU377 in juvenile rats with a 16-weeks recovery period　Study no. 1170516

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | | 100 (Group 2) | | 400 (Group 3) | | 800 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | Main | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 | M: 12 | F: 12 |
| | Recovery | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 | M: 6 | F: 6 |
| Histomorphometry: | | | | | | | | | |
| Cortical Bone (tibia Diaphysis) | | | | | | | | | |
| Tt.T.Ar ($mm^2$) | Main | 3.03 | 2.85 | 2.92 | 2.76 | 3.02 | 2.97 | 2.76 B | 2.77 |
| Me.Ar ($mm^2$) | Main | 1.36 | 1.28 | 1.32 | 1.24 | 1.34 | 1.36 | 1.14 B | 1.29 |
| Ps.Pm (mm) | Main | 6.70 | 6.46 | 6.53 | 6.30 | 6.63 | 6.58 | 6.32 B | 6.33 |
| Ec.Pm (mm) | Main | 4.62 | 4.50 | 4.55 | 4.42 | 4.62 | 4.64 | 4.24 B | 4.49 |
| Ec.dL.Pm/Ec.Pm (%) | Main | 63.9 | 60.0 | 62.7 | 65.9 | 56.6 | 59.1 | 52.8 A | 63.7 |
| Ec.L.Pm/Ec.Pm (%) | Main | 69.4 | 67.9 | 68.6 | 73.1 | 62.1 | 65.6 | 57.9 A | 69.6 |
| **Post dose evaluation:** | | | | | | | | | |
| Clinical biochemistry (Day 147 pp): | | | | | | | | | |
| Calcium (mg/dL) | | 9.54 | 9.14 | 9.47 | 10.03 A | 9.85 | 9.53 | 9.32 | 10.18 B |
| Phosphorus (mg/dL) | | 4.80 | 4.08 | 5.00 | 6.75 A | 6.08 | 5.22 | 4.68 | 6.52 A |
| Urea (mg/dL) | | 16.8 | 21.2 | 18.5 | 21.3 | 16.8 | 21.5 | 22.7 C | 21.0 |
| Glucose (mg/dL) | | 165.4 | 181.4 | 205.2 | 193.5 | 163.3 | 207.2 | 218.3 A | 224.3 |
| Cholesterol (mg/dL) | | 58.2 | 47.2 | 58.0 | 47.3 | 59.8 | 47.0 | 54.8 | 57.3 |
| Triglycerides (mg/dL) | | 65.2 | 44.4 | 55.8 | 64.3 | 50.8 | 53.3 | 83.2 | 56.2 |

- = no noteworthy findings; A = $p \leq 0.05$ B = $p \leq 0.01$ C = $p \leq 0.001$ (Dunnett's test); D = $p \leq 0.05$ E = $p \leq 0.01$ F = $p \leq 0.001$ (Dunn's test)
a = Number of occurrences (number of animal affected)
b = For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
c = Cause of death undetermined.
d = Death attributed to venipuncture/blood collection procedure.
IV = *In vivo*; BMC = Bone Mineral Content; BMD = Bone Mineral Density
PERI_C = Periosteal circumference; ENDO_C = Endosteal circumference; AUC = Area Under the Curve; Tt.T.Ar = Total Tissue Area; Me Ar = Medullary Area; Ps Pm = Periosteal Perimeter; Ec. Pm = Endocortical Perimeter; Content;Ec.dL.Pm/Ec.Pm = Endocortical Double Label Surface; Ec.L.Pm/Ec.Pm = Endocortical Labelled Surface

## 2.6.7.15 D　幼若ウサギを用いた反復投与毒性試験（AHU377）

Report title: A 4-week oral (gavage) dose range-finding bone study with AHU377 in juvenile rabbits with a 7 weeks recovery period　Study no.: [1170514]

Species/strain: Rabbits / NZW　Duration of dosing: 4 weeks　Location in CTD: 4.2.3.5.4-4

Initial age: Day 28 pp (at start of dosing)　Duration of postdose: 7 weeks　GLP compliant: yes

Date of first dose: [redacted]　Method of administration: Oral gavage once daily　Vehicle/formulation: 50 mM phosphate buffer, pH □8.8/ suspensions

Special features: crown rump length, clinical pathology, bone mineral density and bone mineral content assessed using Dual energy X-ray absorptiometry (DXA) and peripheral quantitative computed tomography (pQCT); biochemical markers of bone turnover: osteocalcin and Cross-linked N-Telopeptides of Type I Collagen (NTx), radiography and biomechanical testing of bones.

No-Observed-Adverse-Effect Level: 150 mg/kg/day

| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control; Group 1) | | 5 ( Group 2) | | 50 (Group 3) | | 150 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | M: 16 | F: 16 | M: 16 | F: 16 | M: 16 | F: 16 | M: 16 | F: 16 |
| **Toxicokinetics: AHU377** | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 28 pp | NC | NC | 131 | 152 | 1480 | 892 | 3870 | 4750 |
| (ng•h/mL) | Day 55 pp | NC | NC | 112 | 139 | 1180 | 1470 | 4410 | 6900 |
| Cmax | Day 28 pp | NA | NA | 23.9 | 36 | 227 | 305 | 687 | 908 |
| (ng/mL) | Day 55 pp | NA | NA | 27.7 | 51.2 | 269 | 289 | 1270 | 1440 |
| **Toxicokinetics: LBQ657** | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 28 pp | NC | NC | 3310 | 3590 | 35300 | 19700 | 74200 | 97300 |
| (ng•h/mL) | Day 55 pp | NC | NC | 3920 | 4330 | 37300 | 41200 | 112000 | 136000 |
| Cmax | Day 28 pp | NA | NA | 605 | 707 | 6240 | 7980 | 11400 | 15700 |
| (ng/mL) | Day 55 pp | NA | NA | 744 | 1340 | 8670 | 7150 | 21800 | 19200 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | | |
| Mortality (gavage accidents): | | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Clinical signs | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Body weight [a] (day 53 pp): | | 1509 g | 1475 g | -0.7 | -2.3 | -0.5 | +0.1 | -2.5 | +0.3 |
| Food consumption [a] (day 53-54 pp) | | 120 g | 119 g | -0.8 | +1.7 | -0.0 | +0.8 | +0.8 | -2.5 |

## 2.6.7.15 D　幼若ウサギを用いた反復投与毒性試験（AHU377，続き）

Report title: A 4-week oral (gavage) dose range-finding bone study with AHU377 in juvenile rabbits with a 7 weeks recovery period　Study no.: 1170514

| Dose level (mg/kg/day) | 0 (Control; Group 1) | | 5 (Group 2) | | 50 (Group 3) | | 150 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M: 16 | F: 16 | M: 16 | F: 16 | M: 16 | F: 16 | M: 16 | F: 16 |
| Clinical pathology: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Biomarkers of bone turnover: | | | | | | | | |
| Osteocalcin | - | - | - | - | - | - | - | - |
| NTx | | | | | | | | |
| Crown rump length: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bone densitometry: | | | | | | | | |
| DXA | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pQCT | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Radiography: | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Biomechanical testing: | - | - | - | - | - | - | - | - |

- = No noteworthy findings; NA = Not applicable; NC = Not calculated; pp: post-partum
a = End of dosing period. Control values are shown in grams and percent difference from control are shown for AHU377 treated groups.

## 2.6.7.15 E　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（valsartan）

Report title: VAL489: A subacute oral (gavage) toxicity study in neonatal and juvenile albino rats
Study no.: [0680270]

Species/strain: Rat/Wistar Han Crl:WI (Glx/BRL/Han) IGS BR
Duration of dosing: 64 days from Day 7 to 70 pp
Location in CTD: 4.2.3.5.4-5

Initial age: Day 7 pp (at start of dosing)
Duration of postdose: 6 weeks (Recovery phase) and 10 weeks (Reproductive phase)
GLP compliant: yes

Date of first dose: [redacted]
Method of administration: Oral gavage once daily
Vehicle/formulation: : 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose, type 7 HF, aqueous solutions with 0.5% (v/v) Tween 80, NF / suspension

Special features: Assessment of physical development (vaginal opening, preputial separation), sensory development (auditory function, visual function), behavioral performance (motor activity, Cincinnati watermaze, passive avoidance), reproductive performance (mating, gestation Day 13 uterine examination), male reproductive assessment (motility, spermatozoa count, morphology), clinical pathology (hematology, biochemistry, urinalysis), toxicokinetics, organ weights, gross and histopathological evaluations

No-Observed-Adverse-Effect Level: <1 mg/kg/day

| Dose level (mg/kg/day) | | 0 (Control; Group 1) | | 1 (Group 2) | | 20 (Group 3) | | 150 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| **Toxicokinetic: valsartan** | | | | | | | | | |
| AUC0-24h | Day 7 pp | NC | NC | 16000 | 14300 | 268000 | 320000 | 608000 | 957000 |
| (ng•h/mL) | Day 70 pp | NC | NC | 505 | 430 | 15000 | 14900 | 82500 | 101000 |
| Cmax | Day 7 pp | NA | NA | 916 | 653 | 14000 | 15900 | 117000 | 92900 |
| (ng/mL) | Day 70 pp | NA | NA | 250 | 230 | 5040 | 6510 | 21700 | 28500 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | | |
| Post weaning – Died, missing or sacrificed moribund | | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 4 | 4 |
| Body weight (%[a]): | | | | | | | | | |
| Day 14 pp | | 29.2 g | 28.5 g | 2.1 | 1.1 | 4.3 | 2.7 | 2.8 | 3.1 |
| Day 21pp | | 46.3 g | 45.2 g | -6.3* | -8.4*** | -4.5 | -6.4** | -6.1* | -6.7** |
| Day 69 pp | | 306 g | 193 g | 3.4 | 3.4 | -1.9 | -2.2 | -6.5** | -1.7 |
| Day 114 pp | | 387 g | 233 g | 8.2* | 1.9 | 2.8 | -2.3 | -1.2 | -3.2 |

## 2.6.7.15 E 幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（valsartan，続き）

Report title: VAL489: A subacute oral (gavage) toxicity study in neonatal and juvenile albino rats Study no.: 0680270

| Dose level (mg/kg/day) | 0 (Control; Group 1) | | 1 (Group 2) | | 20 (Group 3) | | 150 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| **Noteworthy findings** | | | | | | | | |
| Food consumption (%a): | | | | | | | | |
| Day 21 to 35 pp (%a) | 216 g | 200 g | -6.0* | -3.5 | -8.8*** | -10.5*** | -14.8*** | -8.5*** |
| Day 35 to 69 pp (%a) | 806 g | 600 g | 6.2** | 6.0** | 4.7* | 2.8 | 1.9 | 3.8 |
| Clinical observations: | | | | | | | | |
| salivation | 2 | 0 | 5 | 2 | 8 | 6 | 17 | 6 |
| Clinical biochemistry [b]: | | | | | | | | |
| Urea (mg/dL) | 16.1 | 18.8 | 23.8** | 25.1* | 29.6*** | 33.2*** | 26.4*** | 34.3*** |
| Creatinine (mg/dL) | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.5** | 0.5* | 0.5* | 0.4 | 0.5*** |
| Potassium (mmol/L) | 5.00 | 4.85 | 5.04 | 4.86 | 5.07 | 4.98 | 4.58 | 4.99 |
| Cholesterol (mg/dL) | 65.4 | 57.4 | 97.9*** | 70.5* | 87.7** | 69.4* | 85.2** | 71.0* |
| Triglycerides (mg/dL) | 104 | 67 | 160 | 76 | 152 | 74 | 128 | 58 |
| Urinalysis – End of Dosing | | | | | | | | |
| Specific gravity | 1.0455 | 1.0410 | 1.0256 | 1.0273 | 1.0196*** | 1.0223** | 1.0205*** | 1.0209*** |
| Organ weightsb (%[a]): | | | | | | | | |
| Prostate - absolute | 0.545 g | NA | 6.4 | NA | 4.9 | NA | 18.5 | NA |
| Gross pathology: | | | | | | | | |
| Kidney | | | | | | | | |
| dilatation, pelvis | 2 | 1 | 11 | 7 | 9 | 8 | 11 | 9 |
| fluid, pale clear | 0 | 1 | 3 | 2 | 1 | 0 | 7 | 3 |
| surface irregular | 0 | 0 | 7 | 3 | 7 | 6 | 7 | 6 |

## 2.6.7.15 E　幼若ラットを用いた反復投与毒性試験（valsartan，続き）

Report title: VAL489: A subacute oral (gavage) toxicity study in neonatal and juvenile albino rats　Study no.: 0680270

| Dose level (mg/kg/day) | 0 (Control; Group 1) | | 1 (Group 2) | | 20 (Group 3) | | 150 (Group 4) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 | M: 52 | F: 52 |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Kidney | | | | | | | | |
| Juxtaglomerular, hypertrophy/hyperplasia | 0 | 0 | 11 | 10 | 10 | 12 | 13 | 12 |
| Nephropathy, tubular | 0 | 0 | 11 | 10 | 10 | 12 | 13 | 13 |
| Dilatation, pelvis | 2 | 1 | 11 | 8 | 9 | 8 | 11 | 9 |
| Stomach | | | | | | | | |
| Vacuolation | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 4 | 5 |
| Infiltration, eosinophilic cell | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| **Additional examinations:** | | | | | | | | |
| Postdose evaluation: | | | | | | | | |
| Number evaluated | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 21 | 20 |
| Histopathology: | | | | | | | | |
| Kidney | | | | | | | | |
| Juxtaglomerular, hypertrophy/hyperplasia | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Nephropathy, tubular | 0 | 0 | 19 | 19 | 20 | 18 | 21 | 19 |
| Dilatation, pelvis | 3 | 2 | 18 | 13 | 20 | 15 | 18 | 14 |

NA = Not applicable; NC = Not calculated; pp: post-partum;

a = For controls, group means are shown. For treated animals, number indicates percent difference from the control absolute organ weights are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences). * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$ (Dunnett / Dunn test)

b = For clinical biochemistry, 10~12 animals were evaluated for each group.

## 2.6.7.16 局所刺激性試験

## 2.6.7.16 A 局所刺激性試験

| Species/ strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | Noteworthy findings | GLP compliance | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rat / Han Wistar | Subcutaneous | 3-day | 200 | M: 5 | Subcutaneous injections of LCZ696 resulted in edema, red discoloration and scab formation at necropsy and, microscopically, edema, necrosis of subcutaneous connective tissue and muscle with subsequent muscle regeneration, inflammation, hemorrhage and ulceration with scab formation.<br>Exposure to AHU377 and LBQ657 when given subcutaneously, was comparable to the oral (gavage) route of administration, however, the exposure to valsartan was 4-fold higher via subcutaneous injection.<br>LCZ696 was not tolerated when administered to rats as three single daily injections. | No | [0670623] | 4.2.3.6-1 |
| Rat / Han Wistar | Oral (gavage) , subcutaneous | 2-week | 0, 200 | M: 10 | Not tolerated at injection site (marked inflammation).<br>Gastritis present after oral, but not subcutaneous administration, consistent with local toxicity potential of LCZ696.<br>Systemic exposure to AHU377 and LBQ657 was higher by subcutaneous route relative to oral route. | No | [0670624] | 4.2.3.6-2 |

## 2.6.7.16 B　局所刺激性試験

| Species/ strain | Method of administration | Duration of dosing | Doses (mg/animal) | Gender and no. per group | Noteworthy findings | GLP compliance | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse / BALB/c | Dermal, LLNA | 3-days | 0, 0.5, 5, 50% | F: 6 | AHU377 did show a statistically significant decrease in ear weight at 0.5% and a statistically significant increase at 50% concentration.<br>AHU377 did cause dose related increases in lymph node weights and cell counts when compared to the vehicle control.<br>In conclusion, AHU377 appeared to be a weak sensitizer with weak irritating potential in the murine LLNA TIER 1. | Yes | [0770750] | 4.2.3.6-3 |
| Rabbit / NZW | Epidermal semi-occlusive (moistened with water) | 4 hours | 500 | M: 3 | No skin irritation was seen. | Yes | [0770751] | 4.2.3.6-4 |
| Rabbit / NZW | conjunctival sac of the eye (as delivered) | NA | 0.1 ml (approx. 30 mg) | M: 3 | The corneal injury consisted of opacity (maximum grade 1) and epithelial damage (maximum 75% of the corneal area).<br>Iridial irritation grade 1 was observed and had resolved within 48 hours in two animals and within 72 hours in the remaining animal.<br>The irritation of the conjunctivae consisted of redness, chemosis and discharge and had completely resolved within 7 days in one animal and within 14 days in the other two animals.<br>Remnants of the test substance were present in the eye on Days 1 and/or 2. | Yes | [0770752] | 4.2.3.6-5 |

NZW = New Zealand White

## 2.6.7.17　その他の毒性試験

## 2.6.7.17 A　その他の毒性試験－Aβ 代謝への影響

Report title: LCZ696: A 16-Day Oral (gavage) investigational study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta in the female Cynomolgus Monkey

Study no.: [1270586, 1270586A]

Species/strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)

Duration of dosing: 16 days

Location in CTD: 4.2.3.7.3-1-1, 4.2.3.7.3-1-2

Initial age: Approximately 2.5 to 4 years old

Duration of postdose: none

GLP compliance: No

Date of first dose[redacted]

Method of administration: oral gavage

Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) sodium carboxymethylcellulose,type 7HF, aqueous solution / suspension

Special features:

Serial sampling of CSF fluid from cisterna magna ports on days 1 and 15 for analysis of drug exposure and Amyloid Beta. Stable Isotope Labeling Kinetics (SILK) assessment of CNS Amyloid Beta was determined based on 12hr femoral catheter infusions of stable isotope labeled $^{13}C_6$ and serial sampling of blood and CSF from cisterna magna ports during the main phase prior to dosing with LCZ696 on days 1 and 15. Sampling of brain, CSF and plasma at necropsy (2 hr post dose day 16) for analysis of drug exposure and amyloid beta. A pilot phase was included to validate the SILK methodology at the test facility and these animals (n=9, of which 8 had patent CSF ports) received a 12 hr infusion of stable isotope labeled $^{13}C_6$ and serial sampling of blood and CSF from cisterna magna ports however LCZ696 was not administered to these animals and results are not included in this tabulated summary.

| Daily dose (mg/kg) | | | | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) |
|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | | | F:18 | F:18 |
| **Toxicokinetics: Treatment phase** | | | | | |
| AHU377 | Plasma | AUC0-24h | Day 1 | NA | 15900 |
| | | (ng•h/mL) | Day 15 | NA | 21500 |
| | | Cmax | Day 1 | NA | 7040 |
| | | (ng/mL) | Day 15 | NA | 10000 |
| | CSF [a] | AUC0-24h | Day 1 | NA | 38.7 |
| | | (ng•h/mL) | Day 15 | NA | 36.5 |
| | | Cmax | Day 1 | NA | 10.8 |
| | | (ng/mL) | Day 15 | NA | 11.0 |

## 2.6.7.17 A　その他の毒性試験－Aβ 代謝への影響（続き）

Report title: LCZ696: A 16-day oral (gavage) investigational study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta in the female Cynomolgus monkey　Study no.: 1270586

| Daily dose (mg/kg) | | | | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) |
|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | | | F:18 | F:18 |
| **Toxicokinetics: Treatment phase (cont.)** | | | | | |
| LBQ657 [b] | Plasma | AUC0-24h | Day 1 | NA | 73100 |
| | | (ng•h/mL) | Day 15 | NA | 83200 |
| | | Cmax | Day 1 | NA | 27100 |
| | | (ng/mL) | Day 15 | NA | 34400 |
| | CSF [a] | AUC0-24h | Day 1 | NA | 129 |
| | | (ng•h/mL) | Day 15 | NA | 128 |
| | | Cmax | Day 1 | NA | 24.2 |
| | | (ng/mL) | Day 15 | NA | 19.8 |
| valsartan | Plasma | AUC0-24h | Day 1 | NA | 7490 |
| | | (ng•h/mL) | Day 15 | NA | 6920 |
| | | Cmax | Day 1 | NA | 1890 |
| | | (ng/mL) | Day 15 | NA | 2000 |
| | CSF [a] | AUC0-24h | Day 1 | NA | 5.04 |
| | | (ng•h/mL) | Day 15 | NA | 7.42 |
| | | Cmax | Day 1 | NA | 1.47 |
| | | (ng/mL) | Day 15 | NA | 0.862 |

## 2.6.7.17 A　その他の毒性試験－Aβ 代謝への影響（続き）

Report title: LCZ696: A 16-day oral (gavage) investigational study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta in the female Cynomolgus monkey Study no.: 1270586

| | | | |
|---|---|---|---|
| Daily dose (mg/kg) | | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) |
| Number of animals | | F:18 | F:18 |
| **Toxicokinetics: at necropsy (Day 16, 2hr post dose)** [c] | | | |
| AHU377 | Cerebral cortex (ng/g) | NA | 37.1 |
| | Hippocampus (ng/g) | NA | 34.9 |
| | CSF (ng/mL) | NA | 7.61 |
| | Plasma (ng/mL) | NA | 1730 |
| LBQ657 [b] | Cerebral cortex (ng/g) | NA | 147 |
| | Hippocampus (ng/g) | NA | 114 |
| | CSF (ng/mL) | NA | 20.7 |
| | Plasma (ng/mL) | NA | 14900 |
| valsartan | Cerebral cortex (ng/g) | NA | 20.7 |
| | Hippocampus (ng/g) | NA | 36.9 |
| | CSF (ng/mL) | NA | 0.574 |
| | Plasma (ng/mL) | NA | 1130 |
| **Noteworthy findings** | | | |
| Mortality | | 0 | 1/18 [d] |
| Clinical Signs | | - | - |
| Body Weight | | - | - |
| Food Consumption | | - | - |
| Body Temperature | | - | - |

## 2.6.7.17 A　その他の毒性試験－Aβ 代謝への影響（続き）

Report title: LCZ696: A 16-day oral (gavage) investigational study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta in the female Cynomolgus monkey Study no.: 1270586

| Daily dose (mg/kg) | | | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) |
|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | | F:18 | F:18 |
| **Amyloid Beta (Aβ) in CSF (%[e]): AUC0-24h (ng•h/mL)** | | | | |
| Newly synthesized Aβ | Day 1 | Aβ Total | 57.7 ±4.82 | +10.2% |
| (labeled) | | Aβ42 | 6.82 ± 0.51 | +20.4%* |
| | | Aβ40 | 58.2± 4.63 | +12.8% |
| | | Aβ38 | 9.47± 0.68 | +15.1% |
| | Day 15 | Aβ Total | 60.9± 5.28 | +50.4%*** |
| | | Aβ42 | 7.82± 0.78 | +34.7%*** |
| | | Aβ40 | 64.8± 7.32 | +23.4%** |
| | | Aβ38 | 10.3± 1.18 | +64.1%*** |
| Total Aβ | Day 1 | Aβ Total | 188 ± 11.6 | +16.2% |
| (labeled + unlabeled) | | Aβ42 | 22.5 ± 1.49 | -7.4% |
| | | Aβ40 | 144 ± 9.68 | -0.9% |
| | | Aβ38 | 30.5 ± 1.84 | +27.0%* |
| | | Aβ37 | 10.7 ± 0.55 | +27.1%* |
| | Day 15 | Aβ Total | 176 ± 31.5 | +44.7%* |
| | | Aβ42 | 18.7 ± 3.29 | +33.5%* |
| | | Aβ40 | 137 ± 16.1 | +26.3% |
| | | Aβ38 | 29.1 ± 3.25 | +61.5%** |
| | | Aβ37 | 9.86 ± 0.90 | +86.1%** |

## 2.6.7.17 A　その他の毒性試験－Aβ 代謝への影響（続き）

Report title: LCZ696: A 16-day oral (gavage) investigational study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta in the female Cynomolgus monkey　Study no.: 1270586

| Daily dose (mg/kg) | | | | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) |
|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | | | F:18 | F:18 |
| **Elimination half-life (%[e]):** | | | | | |
| Newly synthesized Aβ in CSF | | Day 1 | Aβ Total | 5.20 ± 0.47 hours | +29.8%* |
| | | | Aβ42 | 5.83 ± 0.71 | +65.3%* |
| | | | Aβ40 | 5.16 ± 0.60 | +35.2%* |
| | | | Aβ38 | 5.53 ±0.46 | +38.1% |
| | | Day 15 | Aβ Total | 4.84 ± 0.25 | +5.7% |
| | | | Aβ42 | 7.20 ± 1.73 | -15.6% |
| | | | Aβ40 | 4.77 ± 0.21 | +2.7% |
| | | | Aβ38 | 5.83 ± 0.74 | -9.7% |
| **Concentration of Aβ (%[e])** | | | | | |
| Plasma | Day 1 | Aβ42 | 0 hr post dose | 0.040 ± 0.010 ng/mL | +7.0% |
| | | | 2 hr post dose | 0.044 ± 0.019 ng/mL | +23.0% |
| | | | 12 hr post dose | 0.044 ± 0.012 ng/mL | +20.0% |
| | | Aβ40 | 0 hr post dose | 0.29 ± 0.14 ng/mL | -7.0% |
| | | | 2 hr post dose | 0.34 ± 0.19 ng/mL | +21.0% |
| | | | 12 hr post dose | 0.30 ± 0.16 ng/mL | +27.0% |
| | Day 15 | Aβ42 | 0 hr post dose | 0.035 ± 0.012 ng/mL | +23.0% |
| | | | 2 hr post dose | 0.036 ± 0.019 ng/mL | +11.0% |
| | | | 12 hr post dose | 0.045 ± 0.011 ng/mL | +42.0% |
| | | Aβ40 | 0 hr post dose | 0.23 ± 0.094 ng/mL | +35.0% |
| | | | 2 hr post dose | 0.22 ± 0.078 ng/mL | +36.0% |
| | | | 12 hr post dose | 0.28 ± 0.086 ng/mL | +54.0%*** |

## 2.6.7.17 A　その他の毒性試験－Aβ 代謝への影響（続き）

Report title: LCZ696: A 16-day oral (gavage) investigational study of cerebrospinal fluid drug levels and amyloid beta in the female Cynomolgus monkey Study no.: 1270586

| Daily dose (mg/kg) | | | | 0 (Control – Group 1) | 50 (Group 2) |
|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | | | F:18 | F:18 |
| **Concentration of Aβ (%[e]) – at necropsy (2 hr post dose) [c]** | | | | | |
| Brain | Day 16 | Aβ42 | Cortex | 25.9 ± 4.57 pg/mg protein | +14.2% |
| | | | Hippocampus | 20.0 ± 3.91 | -1.2% |
| | | Aβ40 | Cortex | 127 ± 29.0 | +18.6% |
| | | | Hippocampus | 116 ± 32.9 | +3.9% |
| Plasma | Day 16 | Aβ42 | | 0.00893 ± 0.00256 ng/mL | +52.0% |
| | | Aβ40 | | 0.282 ± 0.0367 | +42.3%* |
| CSF | Day 16 | Aβ42 | | 0.636 ± 0.479 ng/mL | -1.4% |
| | | Aβ40 | | 6.72 ± 4.93 | +8.6% |
| | | Aβ37 | | 0.493 ± 0.416 | +37.3% |

N/A: not applicable; - = No noteworthy findings

a = CSF samples collected on days 1 and 15 were pooled prior to analysis (*i.e.* up to 3 animals/pool for a total of 6/group/timepoint for TK analysis; 3 animals/pool for Aβ analysis).

b = LBQ657 is the active metabolite of AHU377.

c = Nine animals/group were sacrificed on day 16 at 2 hours postdose and brain, CSF and plasma samples were collected for concentration analysis (non-pooled).

d = Female no. 2501 was preterminally euthanized on Day 14 due to poor condition. This mortality was attributed to the experimental procedure.

e = At the end of the dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance based on actual data (not on the percent difference).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student's t-Test).

## 2.6.7.17 B　その他の毒性試験－骨への影響

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UMR106 osteosarcoma cells | *In vitro* | NA | AHU377: 0.1-100 µM<br>LBQ657: 0.1-100 µM | NA | NA | Mineralization of UMR-106 cells was not affected by incubation with CNP in concentrations ranging from 0.01 nM to 1 µM. The above results indicate that UMR-106 cells express very low levels of CNP mRNA and protein, and that exogenous CNP does not affect mineralization in these cells. Based on these data, NEP inhibition would not be expected to have an effect on mineralization in UMR-106 cells. The NEP inhibitors LBQ657 and AHU377 did not impact mineralization in UMR-106 cells in concentrations ranging from 0.1 to 100 µM. | [1170517] | 4.2.3.7.3-2 |

a = no observed adverse-effect level; NA = Not applicable;  CNP = C-type natriuretic peptide; NEP = neprilysin

## 2.6.7.17 C　その他の毒性試験－骨への影響

Report title: AHU377: A 13-week oral (gavage) investigative bone study in the 19-week old female Wistar Hannover rat with an 8-week recovery period

Study no.: [1270139]

Species/strain: Rats / Crl:WI(Han)

Duration of dosing: at least 13 weeks

Location in CTD: 4.2.3.7.3-3

Initial age: Approximately 19 weeks (at start of dosing)

Duration of postdose: at least 8 weeks

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]20[redacted]

Method of administration Oral (gavage)

Vehicle/formulation: 0.5% (w/v) hydroxypropylcellulose (grade HF), NF (Klucel), aqueous solution/ suspensions

Special features: Bone markers, hormones, bone densitometry.

No Observed Adverse-Effect Level: Not applicable. The effects of AHU377 at 400 mg/kg/day were minimal relative to the effects of methylprednisolone at the tested dose and considered of no biological relevance.

| Daily dose (mg/kg/day) | | | 0 (Control-Group 1) | 3 (Methylprednisolone-Group 2) | 100 (AHU377-Group 3) | 400 (AHU377- Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals (Main) | | | F:20 | F:20 | F:20 | F:20 |
| **Toxicokinetics:** | | | | | | |
| **AHU377** | AUC0-24h | Day 1 | NC | NA | 806 | 4460 |
| | (ng•h/mL) | Day 78 | NC | NA | 1020 | 4130 |
| | Cmax | Day 1 | NA | NA | 394 | 745 |
| | (ng/mL) | Day 78 | NA | NA | 508 | 1080 |
| **LBQ657** | AUC0-24h | Day 1 | NC | NA | 38600 | 152000 |
| | (ng•h/mL) | Day 78 | NC | NA | 71200 | 263000 |
| | Cmax | Day 1 | NA | NA | 17000 | 27600 |
| | (ng/mL) | Day 78 | NA | NA | 24500 | 70600 |
| **Noteworthy findings:** | | | | | | |
| Clinical signs: | | | - | thin, fur oily, suspected dehydration, prominent backbone, thinning and yellow staining of the fur | - | - |
| Body weight (%) [a]: | | | 243.6 g | -18.7 | +2.1 | +0.4 |
| Food consumption: | | | - | - | - | - |

## 2.6.7.17 C　その他の毒性試験－骨への影響（続き）

Report title: AHU377: A 13-week oral (gavage) investigative bone study in the 19-week old female Wistar Hannover rat with an 8-week recovery period　Study no. 1270139

| Daily dose (mg/kg/day) | | 0 (Control-Group 1) | 3 (Methylprednisolone-Group 2) | 100 (AHU377-Group 3) | 400 (AHU377-Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | F:20 | F:20 | F:20 | F:20 |
| **Noteworthy findings:** | | | | | |
| Clinical Chemistry (Day 87): | | | | | |
| Ca (mg/dL) | | 10.98 | 11.12 | 10.62 | 10.85 |
| Urine Chemistry (Day 87): | | | | | |
| Ca (mg/dL) | | 16.23 | 33.63 | 23.23 | 20.16 |
| Bone formation markers | | | | | |
| Osteocalcin (ng/mL): | | 32.13 | 29.84 | 33.33 | 35.49 |
| P1NP (ng/mL) | | 7.344 | 7.039 | 5.185 A | 6.470 |
| Bone resorption markers (week 13): | | | | | |
| CTx (ng/mg creatinine) | | 25.839 | 22.667 | 17.519 | 15.833 D |
| DPD (nM/mM creatinine) | | 41.608 | 34.319 | 34.099 | 39.767 |
| Hormones: | | | | | |
| 1,25-dihydroxyvitamin D (pmol/L) | | 64.58 | 42.09 | 93.24 | 83.38 |
| Parathyroid hormone (pg/mL) | | 994.82 | 728.00 | 856.02 | 887.34 |
| Bone densitometry evaluations: | | | | | |
| DXA | | | | | |
| Lumbar spine | | | | | |
| Area [b] | Week 4/5 | 7.180 | 4.679 | 6.608 | 4.982 |
| | Week 13/14 | 11.908 | 6.602 A | 11.286 | 8.735 |
| | Week 21 | 14.539 | 11.383 | 14.323 | 12.399 |
| BMC [b] | Week 4/5 | 16.329 | 14.333 | 12.699 | 10.794 D |
| | Week 13/14 | 25.762 | 18.756 | 21.289 | 17.829 |
| | Week 21 | 32.030 | 24.152 | 26.869 | 27.380 |

## 2.6.7.17 C　その他の毒性試験－骨への影響（続き）

Report title: AHU377: A 13-week oral (gavage) investigative bone study in the 19-week old female Wistar Hannover rat with an 8-week recovery period Study no. 1270139

| Daily dose (mg/kg/day) | | 0 (Control-Group 1) | 3 (Methylprednisolone-Group 2) | 100 (AHU377-Group 3) | 400 (AHU377-Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | F:20 | F:20 | F:20 | F:20 |
| BMD [b] | Week 4/5 | 8.5102 | 9.2284 | 5.6908 | 5.5626 |
| | Week 13/14 | 12.3043 | 11.3727 | 8.9873 | 8.2967 |
| | Week 21 | 15.1321 | 11.4300 | 10.9407 | 13.2909 |
| Right femur – mid | | | | | |
| BMC [b] | Week 4/5 | 13.371 | 9.129 | 10.615 | 12.221 |
| | Week 13/14 | 27.623 | 16.507 | 23.875 | 22.697 |
| | Week 21 | 32.659 | 26.646 | 31.836 | 31.218 |
| BMD [b] | Week 4/5 | 10.2221 | 6.4126 | 9.8022 | 5.2429 |
| | Week 13/14 | 17.2657 | 9.6720 B | 15.4413 | 12.5351 |
| | Week 21 | 21.0179 | 16.9767 | 19.9515 | 16.5092 |
| pQCT | | | | | |
| Right proximal tibia - metaphysis | | | | | |
| Total | | | | | |
| area [b] | Week 4/5 | 1.348 | -0.185 | 0.005 | 0.255 |
| | Week 13/14 | -0.016 | -3.326 | -2.318 | -2.594 |
| | Week 21 | 0.710 | 1.133 | -0.428 | -1.530 |
| BMC [b] | Week 4/5 | 8.475 | 5.409 | 7.131 | 7.435 |
| | Week 13/14 | 13.486 | 3.350 B | 10.549 | 10.901 |
| | Week 21 | 15.174 | 8.847 | 13.190 | 13.337 |
| Right proximal tibia - metaphysis | | | | | |
| Cortical/Subcortical | | | | | |
| BMC [b] | Week 4/5 | 7.832 | 4.812 | 6.333 | 6.885 |
| | Week 13/14 | 12.267 | 2.389 C | 8.788 | 9.229 |
| | Week 21 | 13.453 | 7.156 | 10.918 | 11.037 |

## 2.6.7.17 C　その他の毒性試験－骨への影響（続き）

Report title: AHU377: A 13-week oral (gavage) investigative bone study in the 19-week old female Wistar Hannover rat with an 8-week recovery period　Study no. 1270139

| Daily dose (mg/kg/day) | | 0 (Control-Group 1) | 3 (Methylprednisolone-Group 2) | 100 (AHU377-Group 3) | 400 (AHU377-Group 4) |
|---|---|---|---|---|---|
| Number of animals | | F:20 | F:20 | F:20 | F:20 |
| Right proximal tibia – diaphysis | | | | | |
| Total | | | | | |
| area [b] | Week 4/5 | 5.967 | 2.112 A | 6.233 | 5.250 |
| | Week 13/14 | 10.606 | 4.221 B | 8.978 | 7.563 |
| | Week 21 | 12.011 | 8.187 | 9.306 | 10.600 |
| Cortical | | | | | |
| area [b] | Week 4/5 | 6.195 | 3.016 | 7.241 | 6.574 |
| | Week 13/14 | 11.842 | 4.428 B | 11.098 | 9.042 |
| | Week 21 | 12.723 | 7.717 | 11.995 | 10.390 |
| BMC [b] | Week 4/5 | 7.734 | 3.817 A | 8.147 | 7.619 |
| | Week 13/14 | 14.610 | 6.911 E | 13.804 | 11.861 |
| | Week 21 | 16.577 | 10.132 A | 16.035 | 13.699 |
| Periosteal circumference [b] | | | | | |
| | Week 4/5 | 2.9223 | 1.0298 A | 3.0500 | 2.5376 |
| | Week 13/14 | 5.1347 | 2.0559 B | 4.3664 | 3.6666 |
| | Week 21 | 5.8178 | 3.9945 | 4.5225 | 5.1124 |
| Right proximal tibia – diaphysis | | | | | |
| Endosteal circumference [b] | | | | | |
| | Week 4/5 | 2.6698 | -1.0367 | 1.2963 | -0.2926 |
| | Week 13/14 | 3.3446 | 1.9102 | -0.0820 | -0.7202 |
| | Week 21 | 4.6879 | 5.4090 | -1.3057 | 5.7275 |

## 2.6.7.17 C　その他の毒性試験－骨への影響（続き）

Report title: AHU377: A 13-week oral (gavage) investigative bone study in the 19-week old female Wistar Hannover rat with an 8-week recovery period　Study no. 1270139

| Daily dose (mg/kg/day) | 0 (Control-Group 1) | 3 (Methylprednisolone-Group 2) | 100 (AHU377-Group 3) | 400 (AHU377-Group 4) |
|---|---|---|---|---|
| Number of animals | F:20 | F:20 | F:20 | F:20 |
| Gross pathology: | - | - | - | - |
| Histopathology: | - | - | - | - |

- = no noteworthy findings; NA = Not applicable; NC = Not calculated; NI: Not interpretable; DXA = dual energy X-ray absorptiometry; pQCT = peripheral quantitative computerized tomography; BMC = bone mineral content; BMD = bone mineral density; CTx = C-telopeptide; DPD = deoxypyridinoline; P1NP = procollagen type I N-terminal propeptide

A = $P \leq 0.05$ B = $P \leq 0.01$ C = $P \leq 0.001$ (Dunnett), significantly different from control group (group 1) value
D = $P \leq 0.05$ E = $P \leq 0.01$ F = $P \leq 0.001$ (Dunn), significantly different from control group (group 1) value

a = For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

b = Percent change from pretreatment value.

## 2.6.7.17 D　その他の毒性試験－その他の試験（AHU377 のマウスを用いた反復投与毒性試験）

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mouse/ CD-1 (Charles River Laboratories, Raleigh, North Carolina | Oral (gavage) 50 mM phosphate buffer / suspension | 13-weeks | 0, 2000 → 1000 | M: 60 | NA | Test article-related moribundity/mortality was noted in males at 2000→1000 mg/kg/day. Test article macroscopic and microscopic changes were seen in the stomach and/or gastrointestinal tract of animals that died or were euthanized moribund. There was no evidence of test article-related lung changes during the course of the study and no evidence of increased Type II pneumocyte and Clara cell proliferation by Ki-67 immunohistochemical labeling and image analysis. | [0670079] | 4.2.3.7.7-1 |
| Mouse/ CD-1 (Charles River Laboratories, Kingston, NY) | Oral (gavage) 50 mM phosphate buffer / suspension | 13-weeks | 0, 1000 | M: 60 | NA | Test article-related mortality was noted in 8/60 animals at 1000 mg/kg/day between days 38 and 75. Test article macroscopic and microscopic changes were seen in the stomach and/or gastrointestinal tract of animals that died. There was no evidence of test article-related lung changes during the study. | [0670080] | 4.2.3.7.7-2 |
| Mouse/ B6C3F1 | Oral (gavage) 50 mM phosphate buffer / suspension | 13-weeks | 0, 1000 → 750 | M: 60, F: 60 | NA | 1000 mg/kg/day AHU377 produced mortality in B6C3F1 mice after a single dose. Following a dose reduction to 750 mg/kg/day, sporadic mortality was still observed in both sexes through the remainder of the study. After 13-weeks of dosing at 750 mg/kg/day, there were no macroscopic changes in the lung. | [0670081] | 4.2.3.7.7-3 |

NA = Not applicable

a = no observed adverse-effect level

## 2.6.7.17 E　その他の毒性試験－その他の試験（*in silico* 解析）

| Species/ strain | Method of administration (vehicle/ formulation) | Duration of dosing | Doses (mg/kg) | Gender and no. per group | NOAEL[a] (mg/kg) | Noteworthy findings | Study number | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NA | *In silico* | NA | NA | NA | NA | Germline and somatic genetic variation in the gene encoding Neprilysin [also known as membrane metallo-endopeptidase (MME), neutral endopeptidase (NEP), and cluster of differentiation 10 (CD10)] does not support a theoretical risk of neprilysin inhibition contributing to neoplastic progression. | [1470340] | 4.2.3.4.3-1 |

NA = Not applicable

a = no observed adverse-effect level