マンジャロ皮下注 2.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 5mg アテオス
マンジャロ皮下注 7.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 10mg アテオス
マンジャロ皮下注 12.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 15mg アテオス

2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.1　緒言 1

2.6.1　緒言

第 2.2 項参照

マンジャロ皮下注 2.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 5mg アテオス
マンジャロ皮下注 7.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 10mg アテオス
マンジャロ皮下注 12.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 15mg アテオス

2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.2　薬理試験の概要文 1
2.6.2.1　まとめ 1
2.6.2.1.1　In vitro 試験 1
2.6.2.1.2　In vivo 試験 2
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 3
2.6.2.2.1　In vitro 試験 3
2.6.2.2.1.1　マウス、ラット、サル及びヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する結合親和性 3
2.6.2.2.1.2　ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する結合親和性 5
2.6.2.2.1.3　ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対するアゴニスト活性並びに GCG 受容体及び GLP-2 受容体に対する選択性（cAMP アッセイ） 5
2.6.2.2.1.4　ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対するアゴニスト活性（[35S] GTPγS アッセイ） 7
2.6.2.2.1.5　ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体における β-アレスチン-2 動員誘発作用 8
2.6.2.2.1.6　ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する受容体内在化刺激作用 8
2.6.2.2.1.7　ラット及びマウス膵島におけるインスリン分泌刺激作用 10
2.6.2.2.1.8　ヒト脂肪細胞における GIP 受容体活性化作用及び脂肪分解作用 13
2.6.2.2.2　In vivo 試験 13
2.6.2.2.2.1　血糖コントロール改善作用：マウスを用いた腹腔内投与グルコース負荷試験（ipGTT） 14
2.6.2.2.2.2　インスリン分泌促進作用：ラットを用いた静脈内投与グルコース負荷試験（ivGTT） 18
2.6.2.2.2.3　インスリン感受性改善作用：インスリン抵抗性ラット及びマウスを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験 20
2.6.2.2.2.4　胃内容排出抑制作用 24
2.6.2.2.2.5　肥満マウスにおける tirzepatide の体重減少作用 26
2.6.2.3　副次的薬理試験 27
2.6.2.4　安全性薬理試験 27
2.6.2.4.1　心血管系に関する試験 28
2.6.2.4.1.1　単回投与安全性薬理試験 28
2.6.2.4.1.2　反復投与毒性試験 29
2.6.2.4.1.3　hERG アッセイ 30
2.6.2.4.2　中枢神経系に関する試験 30
2.6.2.4.3　呼吸系に関する試験 30
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用 30
2.6.2.6　考察及び結論 30
2.6.2.7　図表 32
2.6.2.8　参考文献 32

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

Tirzepatide（LY3298176）は、グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（glucose-dependent insulinotropic polypeptide：GIP）及びグルカゴン様ペプチド-1（glucagon-like peptide-1：GLP-1）の両受容体にアゴニスト活性を示す合成ペプチドである（Coskun et al. 2018）。本項では、tirzepatide に関して実施した一連の薬理試験（概要表 2.6.3.1-1）の結果を詳述する。効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験で得られた主な成績を以下に示す。

2.6.2.1.1　In vitro 試験

In vitro の受容体結合アッセイ及び機能的アッセイにおいて、tirzepatide はラット、マウス、サル及びヒトの GLP-1 受容体及び GIP 受容体の強力かつ選択的なアゴニストであることが示された。

- Tirzepatide はマウス、ラット及びサルの GIP 受容体及び GLP-1 受容体に結合した（DBT201 試験）。
- Tirzepatide はヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に結合し、阻害定数（K_i）値はそれぞれ 0.16 及び 2.94 nM であった（ENDO123 試験）。
- 細胞内環状アデノシン一リン酸（cyclic adenosine monophosphate：cAMP）アッセイにおいて、tirzepatide はヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体にアゴニスト活性を示し、そのアルブミン非存在下での効力［50%効果濃度（half-maximal effective concentration：EC_{50}）値］はそれぞれ 1.01 及び 6.54 nM で、機能的活性化の効力と結合親和性との間に相関性が認められた（ENDO123 試験）。
- Tirzepatide は検討した最高濃度（10 μM）までヒトグルカゴン（GCG）受容体発現細胞でいかなる機能的な反応も誘発しなかった（ENDO123 試験）。また、tirzepatide のグルカゴン様ペプチド-2（glucagon-like peptide-2：GLP-2）受容体アゴニスト活性の効力は天然型 GLP-2 の 21800 分の 1 であった（QSB24 試験）。
- G タンパク質共役受容体（G protein-coupled receptor：GPCR）の刺激性 G タンパク質サブユニット Gsαへのグアノシン三リン酸（guanosine triphosphate：GTP）の動員を指標に受容体アゴニスト活性を測定する試験において、tirzepatide は GLP-1 受容体の強力な部分アゴニストであり、GIP 受容体の強力な完全アゴニストであることが示された（ENDO124 試験）。
- Tirzepatide は、ヒト GLP-1 受容体へのβ-アレスチン-2 の動員を活性化しなかったが、ヒト GIP 受容体へのβ-アレスチン-2 動員を誘発し、その効力は天然型 GIP リガンドと同程度であった（QSB171 試験）。
- Tirzepatide の GLP-1 受容体に対する内在化刺激作用の効力（EC_{50}）及び最大効果（E_{max}）は天然型 GLP-1 より弱く、GIP 受容体に対する内在化刺激作用の効力及び効果は天然型 GIP と同程度であった（ENDO125 試験）。
- 正常マウス及び正常ラットから単離した膵島において、tirzepatide はグルコース依存性インスリン分泌を促進し、EC_{50} 値はそれぞれ 32 及び 16 nM であった。GIP 受容体ノックアウト（knock-out：KO）マウス及び GLP-1 受容体 KO マウスのいずれの膵島においても

tirzepatide はインスリン分泌を促進したことから、両受容体に対して機能的なアゴニスト活性を示すことが確認された（DBT203 試験）。

- ヒト脂肪細胞（内因性に GIP 受容体を発現しているが、GLP-1 受容体は発現していない）において、tirzepatide は cAMP 産生及び脂肪分解を刺激し、その効力はそれぞれ天然型ヒト GIP の 45 倍及び 20 倍であった（ENDO130 試験）。
- Tirzepatide は、検討した最高濃度（300 μM）において、媒体陰性対照と比較してヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（human ether-à-go-go-related gene：hERG）電流を阻害しなかったことから、不整脈誘発リスクは低いと予想された（180917.FMD 試験）。

2.6.2.1.2　In vivo 試験

正常又は食餌誘発性肥満（DIO）マウス及びラット（インスリン抵抗性モデル）を用いて、血糖コントロール及び体重に対する tirzepatide の効果を評価した。カニクイザルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験において、血行動態、呼吸系及び中枢神経系（central nervous system：CNS）機能に関する非臨床安全性薬理評価を行った。また、カニクイザルを用いた単回皮下投与安全性薬理試験において、血行動態パラメータ及び QT/QTc 間隔延長誘発リスク（心電図データに基づく）を評価した。

- 正常ラットを用いた静脈内投与グルコース負荷試験（intravenous glucose tolerance test：ivGTT）において、tirzepatide はグルコース依存性のインスリン分泌を媒体対照の 198%まで増加させ、50%効果用量（half-maximally efficacious dose：ED_{50}）は 0.87 nmol/kg であった（DBT205 試験）。
- 正常マウス、GIP 受容体 KO 又は GLP-1 受容体 KO マウスを用いた腹腔内投与グルコース負荷試験（intraperitoneal glucose tolerance test：ipGTT）において、tirzepatide 投与による血糖コントロールの改善が見られ、tirzepatide が GIP 受容体及び GLP-1 受容体両方を介して作用することが示された（ENDO126 試験）。
- DIO ラットを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験において、tirzepatide の反復投与により全身インスリン感受性が改善することが示された（ENDO127 試験）。DIO マウスを用いた同様のクランプ試験においても、tirzepatide はインスリン感受性を改善させた（ENDO128 試験）。DIO マウスにおける tirzepatide のインスリン感受性の改善には体重依存的及び体重非依存的な機序の両方が寄与していると考えられた（Samms et al. 2021）。Tirzepatide による全身インスリン感受性改善の機序として、褐色脂肪組織（brown adipose tissue：BAT）の分岐鎖アミノ酸（branch chain amino acid：BCAA）の異化経路の活性化が寄与している可能性が示された（ENDO129 試験）。
- Tirzepatide は単回投与により DIO マウスの胃内容排出（gastric emptying：GE）を抑制し、その効果は 10 nmol/kg で最大となった（DBT207 試験）。Tirzepatide を 1 日 1 回 14 日間反復投与後に GE の抑制は認められなかったことから、GE 抑制作用は急性作用であり、タキフィラキシーが生じることが示された（Urva et al. 2020）。
- DIO マウスに tirzepatide を反復投与したとき、統計学的有意かつ用量反応的に体重が減少し、その ED_{50} は 5 nmol/kg であった。体重減少は主に脂肪量の減少によるものであった。Tirzepatide 投与による体重減少には、投与開始から 7～10 日間に生じる顕著な摂餌量減少

と、投与開始 7 日目以降に生じるエネルギー消費量の増加の 2 つのメカニズムが寄与していると考えられた（DBT206 試験; Coskun et at. 2018）。

- DIO マウスに tirzepatide を 2 週間投与すると、血漿中総コレステロール及び肝臓トリグリセリドが統計学的有意かつ用量依存的に減少した（DBT206 試験）。
- サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験において、tirzepatide を 0.5 mg/kg までの用量で週 1 回皮下投与したとき、tirzepatide に関連する神経学的所見、体温の変化、定性的呼吸評価における変化及び呼吸数の変化は認められなかった（8325823 試験）。
- サルに tirzepatide を単回皮下投与したとき、検討した 2 つの用量（0.05 及び 0.15 mg/kg）のいずれにおいても、心拍数増加及び心収縮性減少が認められ、高用量群では血圧上昇も見られた（8323700 試験）。心拍数増加は、サルを用いた 1 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験でも認められた（それぞれ 8325823 試験及び 8336517 試験）。心血管系への影響は、動物で報告されている GLP-1 受容体アゴニストの薬理作用（Goodwill et al. 2014）に一致していた。
- サルに tirzepatide を単回皮下投与したとき（8323700 試験）又は 1 もしくは 6 ヵ月間反復投与毒性試験で反復投与したとき（それぞれ 8325823 試験及び 8336517 試験）、いずれの用量においても、心拍数で補正した QT（QT corrected for heart rate：QTc）間隔の変化は認められなかった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　In vitro 試験

2.6.2.2.1.1　マウス、ラット、サル及びヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する結合親和性

（添付資料 4.2.1.1.1、DBT201 試験）

クローン化ヒト、サル、ラット又はマウス GIP 受容体又は GLP-1 受容体を過剰発現する HEK-293 細胞から調製した細胞膜を用いて、これら受容体に対する tirzepatide の結合親和性を in vitro で評価した。Tirzepatide 及び天然型リガンド［ヒト GIP（1-42）COOH 及びヒト GLP-1（7-37）COOH］について、[^{125}I]標識放射性リガンドの受容体結合に対する tirzepatide の競合的阻害作用をシンチレーション近接アッセイ（scintillation proximity assay：SPA）法により評価した。濃度反応曲線から得られた絶対 IC_{50} 値、添加した[^{125}I]標識放射性リガンド濃度及び各受容体に対する放射性リガンドの解離定数（Kd）から tirzepatide 及び天然型リガンドの K_i 値を算出した。Tirzepatide は長鎖脂肪酸構造を有するためアルブミンへの結合性が高い。アルブミン結合により標的受容体への結合が減少することから、0.1%脂肪酸不含ウシ血清アルブミン（bovine serum albumin：BSA）の存在下及び非存在下（BSA の代わりに 0.1%バシトラシンを添加）の両条件下で結合親和性を測定した。

Tirzepatide は BSA 非存在下でクローン化ヒト及びサル GIP 受容体に結合し、K_i 値はそれぞれ 0.37 及び 0.32 nM であった（表 2.6.2-1）。Tirzepatide は 0.1% BSA 存在下でクローン化ヒト、サル、ラット及びマウス GIP 受容体に結合し、K_i 値はそれぞれ 4.02、1.48、386 及び 646 nM であった（表 2.6.2-2）。Tirzepatide は BSA 非存在下でクローン化ヒト、サル、ラット及びマウス GLP-1 受容体に結合し、K_i 値はそれぞれ 2.88、5.08、1.40 及び 0.84 nM であった（表 2.6.2-3）。

Tirzepatide は 0.1% BSA 存在下でクローン化ヒト、サル、ラット及びマウス GLP-1 受容体に結合し、K_i 値はそれぞれ 378、391、129 及び 88.4 nM であった（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-1.　ウシ血清アルブミン非存在下での GIP 受容体に対する結合親和性

BSA 非存在下（0.1%バシトラシン存在下）での GIP 受容体に対する結合親和性、Ki (nM)（SEM、n）		
ペプチド	ヒト GIP 受容体	サル GIP 受容体
ヒト GIP（1-42）COOH	0.85（0.03、n = 3）	0.67（0.21、n = 3）
Tirzepatide	0.37（0.04、n = 3）	0.32（0.05、n = 3）

略語：GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、Ki = 阻害定数、n = 実験回数、SEM = 標準誤差

表 2.6.2-2.　ウシ血清アルブミン存在下での GIP 受容体に対する結合親和性

0.1%BSA 存在下での GIP 受容体に対する結合親和性、Ki (nM)（SEM、n）				
ペプチド	ヒト GIP 受容体	サル GIP 受容体	ラット GIP 受容体	マウス GIP 受容体
ヒト GIP（1-42）COOH	0.072（0.008、n = 6）	0.018（0.003、n = 6）	0.431（0.070、n = 7）	0.296（0.067、n = 7）
Tirzepatide	4.02（0.37、n = 6）	1.48（0.38、n = 6）	386（69、n = 7）	646（138、n = 7）

略語：GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、Ki = 阻害定数、n = 実験回数、SEM = 標準誤差

表 2.6.2-3.　ウシ血清アルブミン非存在下での GLP-1 受容体に対する結合親和性

BSA 非存在下（0.1%バシトラシン存在下）での GLP-1 受容体に対する結合親和性、Ki (nM)（SEM、n）				
ペプチド	ヒト GLP-1 受容体	サル GLP-1 受容体	ラット GLP-1 受容体	マウス GLP-1 受容体
ヒト GLP-1（7-37）COOH	0.92（0.12、n = 7）	1.22（0.14、n = 3）	1.34（0.34、n = 3）	1.49（0.44、n = 3）
Tirzepatide	2.88（0.31、n = 5）	5.08（0.41、n = 4）	1.40（0.37、n = 4）	0.84（0.06、n = 4）

略語：GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、Ki = 阻害定数、n = 実験回数、SEM = 標準誤差

表 2.6.2-4.　ウシ血清アルブミン存在下での GLP-1 受容体に対する結合親和性

0.1%BSA 存在下での GLP-1 受容体に対する結合親和性、Ki (nM)（SEM、n）				
ペプチド	ヒト GLP-1 受容体	サル GLP-1 受容体	ラット GLP-1 受容体	マウス GLP-1 受容体
ヒト GLP-1（7-37）COOH	1.04（0.23、n = 7）	0.97（0.19、n = 7）	1.07（0.14、n = 7）	1.65（0.26、n = 7）
Tirzepatide	378（52、n = 7）	391（60、n = 7）	129（13、n = 7）	88.4（5.2、n = 7）

略語：GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、Ki = 阻害定数、n = 実験回数、SEM = 標準誤差

以上より、BSA 非存在下でのサル及びヒト GIP 受容体に対する tirzepatide の結合親和性は、天然型GIP と同程度であった。BSA非存在下でのラット及びマウスGLP-1受容体に対する tirzepatide の結合親和性は天然型 GLP-1 と同程度であったが、サル及びヒト GLP-1 受容体に対する結合親和性は天然型 GLP-1 の 3 分の 1～4 分の 1 であった。Tirzepatide の長鎖脂肪酸構造の存在から予測されたように、GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する tirzepatide の結合親和性は BSA 存在下で低下した。

2.6.2.2.1.2 ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する結合親和性

（添付資料 4.2.1.1.2、ENDO123 試験）

クローン化ヒト GLP-1 受容体及びヒト GIP 受容体を発現する HEK-293 細胞から調製した細胞膜を用いて、これら受容体に対する tirzepatide の結合親和性を in vitro で評価した。Tirzepatide 及び天然型リガンド［ヒト GIP（1-42）NH_2 及びヒト GLP-1（7-36）NH_2］について、[^{125}I]標識放射性リガンドの受容体結合に対する競合的阻害作用を SPA 法により評価し、K_i 値を算出した。Tirzepatide 及び天然型リガンドのアルブミン非存在下（アルブミンの代わりに 0.1%バシトラシンを添加）での結合親和性を表 2.6.2-5 に示す。

アルブミン非存在下において、ヒト GLP-1 受容体に対する tirzepatide 及び天然型ヒト GLP-1 の K_i 値はそれぞれ 2.94 及び 0.655 nM であり、ヒト GIP 受容体に対する tirzepatide 及び天然型ヒト GIP の K_i 値はそれぞれ 0.163 及び 0.203 nM であった。

表 2.6.2-5. アルブミン非存在下での GLP-1 受容体及び GIP 受容体に対する結合親和性

ペプチド	ヒト GLP-1 受容体	ヒト GIP 受容体
	K_i (nM)、SEM（n）	**K_i (nM)、SEM（n）**
ヒト GLP-1（7-36）NH_2	0.655、0.055（12）	ND
ヒト GIP（1-42）NH_2	ND	0.203、0.033（12）
Tirzepatide	2.94、0.33（6）	0.163、0.029（6）

略語：GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、n = 実験回数、ND = 測定せず、SEM = 標準誤差

以上より、天然型リガンドの結合親和性との比較から、tirzepatide は GLP-1 受容体よりも GIP 受容体に対し強い結合親和性を示し、GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する不均衡なデュアルアゴニストであることが示された。

2.6.2.2.1.3 ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対するアゴニスト活性並びに GCG 受容体及び GLP-2 受容体に対する選択性（cAMP アッセイ）

（添付資料 4.2.1.1.2、ENDO123 試験）

（添付資料 4.2.1.1.3、QSB24 試験）

ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体は GPCR ファミリーのクラス B のメンバーであり、受容体の活性化によりアデニル酸シクラーゼ（adenylyl cyclase：AC）が活性化されて細胞内 cAMP が増加する。ヒト GLP-1 受容体又はヒト GIP 受容体をそれぞれ低、中及び高密度で発現する HEK-293 細胞（表 2.6.2-6）並びにヒト GCG 受容体を低密度で発現する HEK-293 細胞を用いて、tirzepatide 及び天然型リガンド［ヒト GIP（1-42）NH_2、ヒト GLP-1（7-36）NH_2 及びヒト GCG］による受容体の機能的活性化を、細胞内 cAMP 濃度を指標に評価した。アッセイは 1.0%ヒト血清アルブミン（human serum albumin：HSA）存在下及び非存在下で行い、アルブミン結合による tirzepatide の効力の変化（HSA 非存在下での EC_{50} 値からの変化）を評価した。

ヒト GIP 受容体を低、中及び高発現する HEK-293 細胞において、tirzepatide は HSA 非存在下で天然型ヒト GIP と同程度の効力で受容体を活性化した（EC_{50} 値はそれぞれ 1.01、0.0536 及び 0.00196 nM）（表 2.6.2-6）。ヒト GLP-1 受容体を低、中及び高発現する HEK-293 細胞において、HSA 非存在下での tirzepatide による受容体活性化の効力は天然型ヒト GLP-1 よりも弱かった（EC_{50} 値はそれぞれ 6.54、1.38 及び 0.132 nM）（表 2.6.2-6）。

ヒト GCG 受容体を低発現する HEK-293 細胞において、HSA 非存在下での受容体活性化の効力（EC_{50}）は、天然型ヒトグルカゴンで 1.95 nM であり、tirzepatide はほとんど活性を示さなかった（10 回の測定のうち、7 回については正確な EC_{50} 値の測定ができず、3 回の測定の EC_{50} 値の平均値は 2350 nM であった）。

1.0% HSA 存在下で、tirzepatide は HSA に結合し、その結果 tirzepatide の見かけの効力が低下した。ヒト GLP-1 受容体及びヒト GIP 受容体をそれぞれ低発現する細胞株において、tirzepatide は 1.0% HSA 存在下で受容体アゴニスト活性を維持していたが、見かけの効力（EC_{50} 値）はヒト GLP-1 受容体に対しては 533 nM に、ヒト GIP 受容体に対しては 26.4 nM に減弱した。ヒト GCG 受容体を低発現する細胞株において、HSA 存在下での tirzepatide の EC_{50} 値は測定できなかった。

ヒト GLP-2 受容体を発現する HEK-293 細胞を用いて、tirzepatide の GLP-2 受容体に対するアゴニスト活性も評価した。その結果、ヒト GLP-2 受容体に対する tirzepatide の EC_{50} 値は 249（SEM = 6）nM であり、この効力は天然型 GLP-2［ヒト GLP-2（1-33）OH］の効力［EC_{50} 値：0.0114（SEM = 0.0009）nM］の 21800 分の 1 であった（QSB24 試験）。

以上より、tirzepatide はヒト GIP 受容体及びヒト GLP-1 受容体のデュアルアゴニストであり、天然型リガンドの効力との比較から、GLP-1 受容体よりも GIP 受容体に対する機能的な活性が強かった。HSA 存在下でのヒト GIP 受容体及びヒト GLP-1 受容体に対する tirzepatide の見かけの効力は、HSA 非存在下と比較してそれぞれ 26 分の 1 及び 81 分の 1 に減弱した。

表 2.6.2-6.　アルブミン非存在下（0.1%ウシカゼイン存在下）での GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対するアゴニスト活性の効力（EC_{50} 値）（cAMP アッセイ）

ペプチド	低発現		中発現		高発現	
	GIP 受容体 EC_{50} nM、SEM（n）	**GLP-1 受容体 EC_{50} nM、SEM（n）**	**GIP 受容体 EC_{50} nM、SEM（n）**	**GLP-1 受容体 EC_{50} nM、SEM（n）**	**GIP 受容体 EC_{50} nM、SEM（n）**	**GLP-1 受容体 EC_{50} nM、SEM（n）**
ヒト GIP（1-42）NH_2	0.888、0.114（49）	ND	0.0461、0.0084（12）	ND	0.00224、0.00040（6）	ND
ヒト GLP-1（7-36）NH_2	ND	0.366、0.032（57）	ND	0.0721、0.0061（24）	ND	0.00624、0.00056（14）
Tirzepatide	1.01、0.15（23）	6.54、0.71（22）	0.0536、0.0157（8）	1.38、0.19（11）	0.00196、0.00019（2）	0.132、0.006（9）

略語：EC_{50} = 50%効果濃度、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、n = 実験回数、ND = 測定せず、SEM = 標準誤差

2.6.2.2.1.4　ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対するアゴニスト活性（[35S] GTPγS アッセイ）

（添付資料 4.2.1.1.4、ENDO124 試験）

GIP 受容体及び GLP-1 受容体は GPCR ファミリーのクラス B のメンバーであり、活性化されたヘテロ三量体 G タンパク質の刺激性αサブユニット（Gsα）を介してシグナル伝達を行う。リガンドが受容体を活性化すると、立体構造の変化により、Gsαがグアニンヌクレオチド交換因子として機能し、Gsαはグアノシン二リン酸（guanosine diphosphate：GDP）を放出して GTP に結合する。GTP に結合した Gsαは Gβ/Gγ二量体複合体から解離し、AC にアロステリックに結合して活性化する結果 AC によるアデノシン三リン酸（adenosine triphosphate：ATP）から cAMP への変換能が増強する。

^{35}S 標識グアノシン 5′-（γ-チオ）三リン酸（ [^{35}S]GTPγS）結合アッセイでは、非加水分解性 GTP アナログである[^{35}S] GTPγS の Gsαへの結合を抗体捕捉 SPA 法により測定することで、セカンドメッセンジャーである cAMP よりも上流の受容体活性化シグナルを指標に被験薬の GPCR アゴニスト活性を評価する。[^{35}S]GTPγS 結合アッセイは、受容体と共役した G タンパク質へのグアニンヌクレオチド結合を直接測定するため、完全アゴニストと部分アゴニストを識別可能な評価系とされている（Harrison and Traynor 2003）。ヒト GLP-1 受容体又はヒト GIP 受容体を発現する HEK-293 細胞から調製した細胞膜を用いた[^{35}S]GTPγS 結合アッセイにより、ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する tirzepatide 及び天然型リガンド［ヒト GIP（1-42）NH_2 及びヒト GLP-1（7-36）NH_2］による機能的活性化の効力及び最大効果を評価した。その結果を表 2.6.2-7 に示す。

表 2.6.2-7.　ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する tirzepatide のアゴニスト活性の効力（EC_{50} 値）及び最大効果（E_{max}）（[^{35}S]GTPγS 結合アッセイ）

リガンド	GIP 受容体		GLP-1 受容体	
	EC_{50} nM [a]（SEM、N）	**E_{max} %（SEM、N）**	**EC_{50} nM [a]（SEM、N）**	**E_{max} %（SEM、N）**
ヒト GIP（1-42）NH_2	1.43（0.18、27）	95.1（3.2、27）	ND	ND
ヒト GLP-1（7-36）NH_2	ND	ND	1.63（0.21、26）	95.2（2.2、26）
Tirzepatide	0.379（0.070、3）	95.7（0.5、3）	0.617（0.190、3）	51.0（5.2、3）

略語：EC_{50} = 50%効果濃度、E_{max} = 最大効果、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、N = 実験回数、ND = 測定せず、SEM = 標準誤差

[a]　EC_{50} 値：幾何平均値をナノモル濃度で示し、括弧内に SEM 及び N を示す。

以上より、tirzepatide の GIP 受容体に対する機能的活性化の効力及び最大効果は、天然型 GIP と同程度であった。Tirzepatide の GLP-1 受容体に対する機能的活性化の効力は天然型 GLP-1 と同程度であったが、最大効果（E_{max}）は天然型 GLP-1 の約 50%であった。したがって、tirzepatide は GLP-1 受容体の強力な部分アゴニストであり、GIP 受容体の強力な完全アゴニストであることが示された。

2.6.2.2.1.5 ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体におけるβ-アレスチン-2 動員誘発作用

（添付資料 4.2.1.1.5、QSB171 試験）

GIP 受容体及び GLP-1 受容体を含め多くの GPCR では、リガンドが結合し、G タンパク質共役受容体キナーゼ（G-protein-coupled receptor kinase：GRK）が受容体をリン酸化すると、受容体とβ-アレスチンとの複合体が形成される。β-アレスチンはアダプタータンパク質であり、多くの GPCR において、脱感作、内在化（隔離）、リサイクリング及びダウンレギュレーションによる受容体‐G タンパク質カップリング停止に関与することが知られている（Luttrell and Lefkowitz 2002）。

クローン化ヒト GIP 受容体又は GLP-1 受容体並びにβ-アレスチン-2 を発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）-K1 細胞を用いて、ヒト GLP-1 受容体及びヒト GIP 受容体における tirzepatide のβ-アレスチン-2 動員誘発作用を評価した（アルブミン非存在下）。表 2.6.2-8 に tirzepatide 及び天然型リガンド［ヒト GIP（1-42）OH 及びヒト GLP-1（7-36）NH_2］のβ-アレスチン-2 動員誘発作用の効力（EC_{50} 値）及び最大効果を示す。ヒト GIP 受容体において、tirzepatide によるβ-アレスチン-2 動員の効力（EC_{50} 値：2.3 nM）はヒト GIP（1-42）OH（EC_{50} 値：1.5 nM）と同程度であったが、tirzepatide はヒト GLP-1（7-36）NH_2 とは異なり、ヒト GLP-1 受容体においてβ-アレスチン-2 の動員を誘発しなかった（EC_{50} 値：>10500 nM）。

表 2.6.2-8. ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体におけるβ-アレスチン-2 の動員に対する tirzepatide の効力及び最大効果

リガンド	ヒト GIP 受容体		ヒト GLP-1 受容体	
	EC_{50} nM（SEM、N）	**最大効果%（SD、N）**	**EC_{50} nM（SEM、N）**	**最大効果%（SD、N）**
ヒト GIP（1-42）OH）	1.5（0.5、6）	118（11、6）	ND	ND
ヒト GLP-1（7-36）NH_2	ND	ND	3.3（0.7、14）	117（8、14）
Tirzepatide	2.3（0.6、7）	100（13、7）	>10500（ND、5）	ND（ND、5）

略語：EC_{50} = 50%効果濃度、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、N = 実験回数、ND = 測定せず、SD = 標準偏差、SEM = 標準誤差
EC_{50} は幾何平均値、最大効果は算術平均値を示す。

2.6.2.2.1.6 ヒト GIP 受容体及び GLP-1 受容体に対する受容体内在化刺激作用

（添付資料 4.2.1.1.6、ENDO125 試験）

アゴニスト依存性の GPCR 内在化は、エンドソーム輸送機構のアレスチン動員を介して生じ（Marchese et al. 2008）、クラス B の GPCR アゴニストの薬理作用の差異に関与するといわれている（Jones et al.2018; Gabe et al.2018）。Tirzepatide の作用機序を更に検討するため、ヒト GLP-1 受容体及び GIP 受容体において、tirzepatide による受容体の内在化を天然型リガンド［ヒト GIP（1-42）及びヒト GLP-1（7-36）］と比較した（アルブミン非存在下）。

受容体の内在化を評価するため、ヒト GLP-1 受容体及び GIP 受容体の N 末端に 3X-HA（ヒトヘマグルチニン）タグを、C 末端に高感度緑色蛍光タンパク質（enhanced green fluorescent protein ：EGFP）タグを付加した HA_GLP-1R_EGFP 又は HA_GIPR_EGFP コンストラクトを HEK-293 細胞に安定的に発現させ、種々の濃度の tirzepatide 又は天然型リガンドで処理した後固定し、

抗 HA 抗体を用いた免疫蛍光染色により細胞表面の受容体発現の変化を評価した。Opera Phenix 共焦点画像解析システムで EGFP の蛍光を検出することにより画像を撮影した（図 2.6.2- 1）。また最高濃度の天然型リガンド処理時又はリガンド非処理時に得られたシグナルに対してデータを正規化し、非線形回帰分析（4パラメータフィッティング）により EC_{50} 値及び E_{max} を算出した。

Tirzepatide は GLP-1 受容体の内在化を刺激し、その EC_{50} 値は 101.9 nM、E_{max} は 43.6%であった。これに対し、ヒト GLP-1（7-36）による GLP-1 受容体内在化刺激作用の EC_{50} 値は 22.2 nM、E_{max} は 98.9%であった。Tirzepatide は GIP 受容体の内在化を刺激し、その EC_{50} 値は 18.1 nM で、ヒト GIP（1-42）（EC_{50} 値は 18.2 nM）と同程度であった（表 2.6.2-9）。

以上より、tirzepatide の GLP-1 受容体に対する内在化刺激作用は天然型 GLP-1 より弱く、GIP 受容体に対する内在化刺激作用は天然型 GIP と同程度であった。GLP-1 受容体における受容体内在化刺激作用が弱いことは、GLP-1 受容体への β-アレスチン-2 動員作用が限定的であることと一致していた。

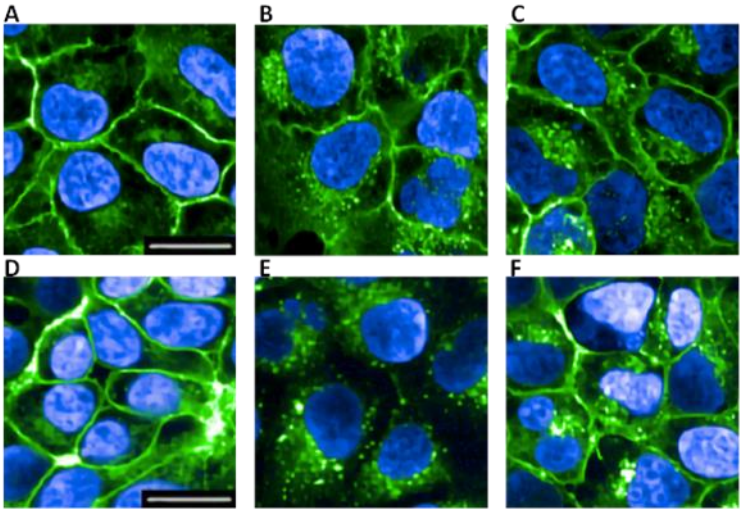
表 2.6.2-9.　GLP-1 受容体及び GIP 受容体に対する tirzepatide の受容体内在化刺激作用

GLP-1 受容体	**EC_{50} nM[a]（SEM、N）**	**E_{max} %[b]（SEM、N）**
Tirzepatide	101.9（29.8、3）	43.6（7.9、3）
ヒト GLP-1（7-36）	22.2（1.86、3）	98.9（0.8、3）
GIP 受容体	**EC_{50} nM[a]（SEM、N）**	**E_{max} %[b]（SEM、N）**
Tirzepatide	18.1（5.7、3）	102.7（10.4、3）
ヒト GIP（1-42）	18.2（9.7、3）	102.7（5.9、3）

略語：EC_{50} = 50%効果濃度、E_{max} = 最大効果、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、N = 反復実験回数、SEM = 標準誤差

a　EC_{50} 値は 3 回の反復実験の幾何平均値 ± SEM で示す。

b　E_{max} 値は 3 回の反復実験の算術平均値 ± SEM で示す。



略語：EGFP = 高感度緑色蛍光タンパク質、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1
HA-GIPR-EGFP を安定的に発現させた細胞を（A）媒体、（B）100 nM GIP（1-42）又は（C）100 nM tirzepatide で処理した後に EGFP の蛍光を検出した代表的な共焦点顕微鏡画像及び HA-GLP-1R-EGFP を安定的に発現させた細胞を（D）媒体、（E）100 nM GLP-1（7-36）又は（F）100 nM tirzepatide で処理した後に EGFP の蛍光を検出した代表的な共焦点顕微鏡画像
スケールバー：20 μm

図 2.6.2- 1　HEK-293 細胞における GLP-1 受容体及び GIP 受容体の内在化

2.6.2.2.1.7　　ラット及びマウス膵島におけるインスリン分泌刺激作用

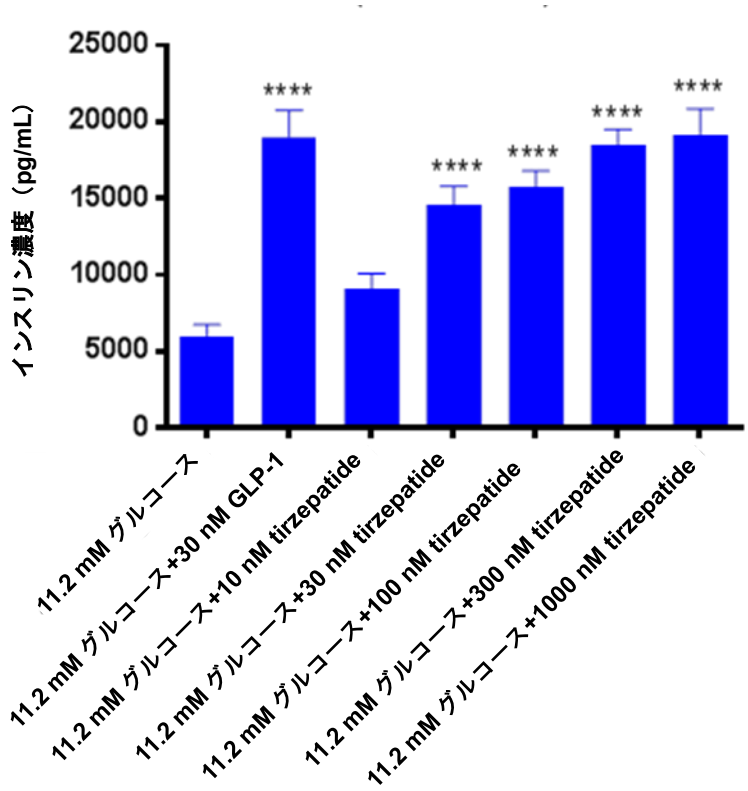
（添付資料 4.2.1.1.7、DBT203 試験）

インクレチンである GIP 及び GLP-1 がグルコース依存性にインスリン分泌を促進させることはよく知られている。ラット及びマウス膵島を用いてグルコース依存性インスリン分泌に関する tirzepatide の効力を in vitro で測定した。また、GIP 受容体 KO 又は GLP-1 受容体 KO マウスの膵島を用いて、GIP 受容体又は GLP-1 受容体いずれか一方のみが存在する条件下でグルコース依存性インスリン分泌作用に関する tirzepatide の効力を測定し、GIP 及び GLP-1 デュアルアゴニストである tirzepatide の特性を評価した。

Sprague Dawley ラット並びに野生型、GIP 受容体 KO 又は GLP-1 受容体 KO マウスから単離した膵島を 0.1% BSA、2.8～11.2 mM のグルコース及び種々の濃度の tirzepatide の存在下で 90 分間インキュベートした（1well につき 4 個の膵島を用い、1 アッセイにつき 6 well/dose で実施した）。陽性対照として 30 nM GIP 又は 30 nM GLP-1（7-36）アミドを使用した。またマウス検体中のインスリン濃度は、市販のアッセイキットを用いて測定した。ラットの検体中のインスリン濃度は、社内で構築した電気化学発光法（electrochemiluminescence：ECL）インスリンアッセイにより測定した。EC_{50} 値は、データに 4 パラメータシグモイド型濃度反応関数を適合させることにより推定した。

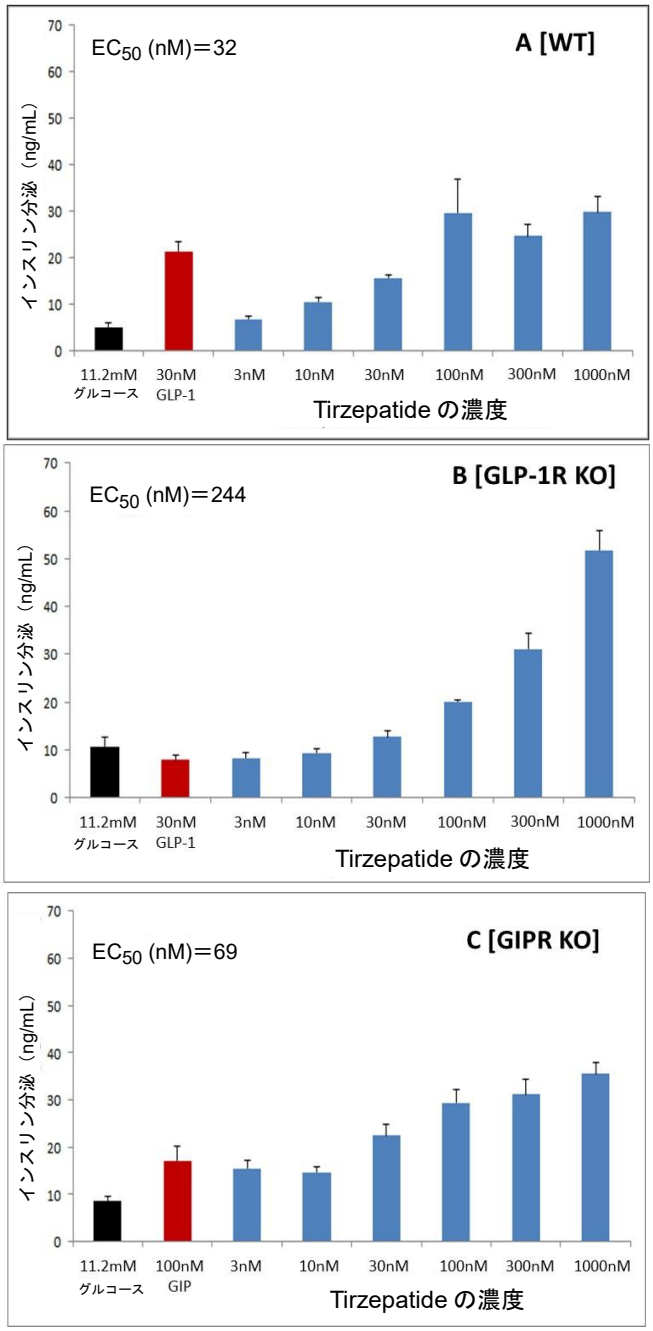
Tirzepatide はラット膵島からのインスリン分泌を促進し、その EC_{50} 値は 15.5 ± 7.0 nM（平均値 ± SEM、n = 3）であった。図 2.6.2- 2 は 3 回の独立した実験のうち 1 回の結果を示す。

野生型、GIP 受容体 KO 又は GLP-1 受容体 KO マウスから摘出した初代培養膵島を 11.2 mM グルコース及び種々の濃度の tirzepatide で処理したとき、tirzepatide はインスリン分泌を濃度依存的に促進し、EC_{50} 値はそれぞれ 32、69 及び 244 nM であった（図 2.6.2- 3）。



略語：ANOVA = 分散分析、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、SEM = 標準誤差
****p<0.001（11.2 mM グルコース単独処理群との比較）。Brown-Forsythe 及び Welch ANOVA 検定並びに Dunnett 検定。結果は 3 回の独立した実験のうち 1 回の結果であり、6 well/dose の平均値±SEM を示す。

図 2.6.2- 2　ラット膵島における tirzepatide のインスリン分泌促進作用



略語：EC_{50} = 50%効果濃度、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、GLP-1R KO = GLP-1 受容体ノックアウト、GIPR KO = GIP 受容体ノックアウト、WT = 野生型
野生型マウス膵島（A）、GLP-1 受容体 KO マウス膵島（B）及び GIP 受容体 KO マウス膵島（C）からのインスリン分泌に対する tirzepatide の刺激作用。独立した実験を 1 回実施した。値は 6 well/dose の平均値±標準偏差を示す。

図 2.6.2- 3　野生型、GLP-1 受容体 KO 又は GIP 受容体 KO マウスの膵島における tirzepatide のインスリン分泌促進作用

以上より、tirzepatide はげっ歯類の摘出膵島においてインスリン分泌を強力に促進し、GIP 受容体又は GLP-1 受容体のうち一方しか発現していない場合でもインスリン分泌促進作用は維持されることが示された。

2.6.2.2.1.8 ヒト脂肪細胞における GIP 受容体活性化作用及び脂肪分解作用

（添付資料 4.2.1.1.8、ENDO130 試験）

内因性 GIP 受容体を発現するヒト脂肪細胞を用いて、アルブミン非存在下での tirzepatide による GIP 受容体アゴニスト活性及び脂肪分解作用を評価し、その効力を天然型ヒト GIP と比較した。本試験で使用した分化ヒト脂肪細胞は内因性 GIP 受容体を発現し、天然型 GIP 処理による GIP 受容体の活性化（cAMP 産生）及び脂肪分解の誘導（遊離脂肪酸産生）が確認されている。単離された培養ヒト前駆脂肪細胞を前駆脂肪細胞培地中で 1 日間培養した後、脂肪細胞分化培地中で 6 日間培養し、脂肪細胞維持培地中で更に 6 日間培養し、成熟脂肪細胞に分化させた。分化した脂肪細胞を、アルブミン非存在下で、種々の濃度の tirzepatide 又は天然型ヒト GIP で処理した後、細胞内 cAMP 濃度及び培養上清中のグリセロール濃度を測定した。独立した 3 回の実験で得られた cAMP 及び脂肪分解に対する EC_{50} 値及びその平均値を表 2.6.2-10 及び表 2.6.2-11 に示す。

Tirzepatide は、分化ヒト脂肪細胞における cAMP 産生（表 2.6.2-10）及び脂肪分解（表 2.6.2-11）を促進し、その効力（アルブミン非存在下）は天然型ヒト GIP と比較してそれぞれ 45 及び 20 倍高かった。

表 2.6.2-10. 脂肪細胞における cAMP 産生に対する tirzepatide 及びヒト GIP の効力

	実験 1 EC_{50}（M）	実験 2 EC_{50}（M）	実験 3 EC_{50}（M）	平均 EC_{50}[a]（SEM、n = 3）
Tirzepatide	4.546E-11	2.56E-11	1.44E-09	1.19E-10（1.5E-10）
ヒト GIP	3.002E-09	4.27E-09	1.21E-08	5.37E-09（2.24E-09）

略語：EC_{50} = 50%効果濃度、n = 実験回数、SEM = 標準誤差
[a] EC_{50} 値は幾何平均値で示し、括弧内に SEM 及び n を示す。

表 2.6.2-11. 脂肪細胞の脂質分解に対する tirzepatide 及びヒト GIP の効力

	実験 1 EC_{50}（M）	実験 2 EC_{50}（M）	実験 3 EC_{50}（M）	平均 EC_{50}[a]（SEM、n = 3）
Tirzepatide	2.04E-11	1.16E-11	6.93E-12	1.18E-11（3.7E-12）
ヒト GIP	1.79E-10	9.05E-10	8.57E-11	2.4E-10（1.7E-10）

略語：EC_{50} = 50%効果濃度、n = 実験回数、SEM = 標準誤差
[a] EC_{50} 値は 幾何平均値で示し、括弧内に SEM 及び n を示す。

2.6.2.2.2 In vivo 試験

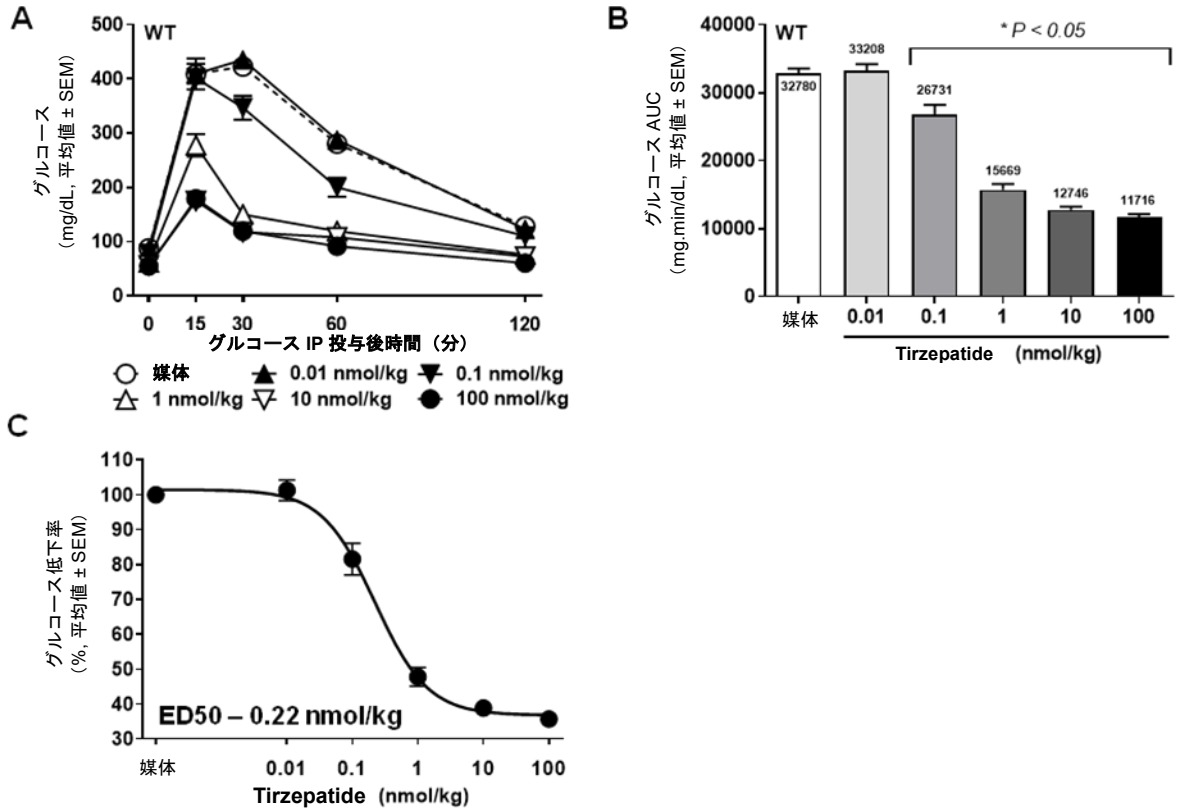
マウス及びラットにおける血糖コントロール、グルコース依存性インスリン分泌及びインスリン感受性並びに肥満マウスにおける体重に対する tirzepatide の作用を in vivo で評価した。

2.6.2.2.2.1　血糖コントロール改善作用：マウスを用いた腹腔内投与グルコース負荷試験（ipGTT）

（添付資料 4.2.1.1.9、ENDO126 試験）

GIP 受容体及び GLP-1 受容体における tirzepatide の in vivo での機能的活性を確認するため、雄の正常マウス（野生型 C57Bl/6）、GIP 受容体 KO（*GIPr*$^{-/-}$）又は GLP-1 受容体 KO（*GLP-1r*$^{-/-}$）マウスを用いた ipGTT において tirzepatide を単独又は GLP-1 受容体アンタゴニストとの併用で単回皮下投与したときの血糖コントロール改善作用を評価した。

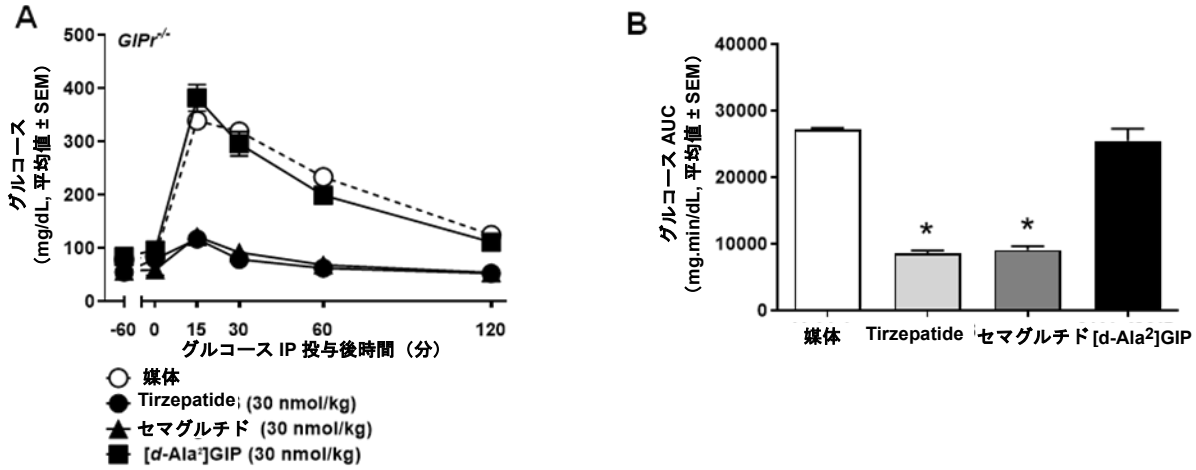
正常マウスを用いた ipGTT において、tirzepatide は単独投与により血糖コントロールを改善し、0.01、0.1、1、10 及び 100 nmol/kg の用量で用量依存的に血糖値－時間曲線下面積（グルコース AUC）を低下させた。0.1、1、10 及び 100 nmol/kg の用量で媒体群と比較して統計学的有意差が認められ、ED_{50} 値は 0.22 nmol/kg であった（図 2.6.2- 4）。



略語：ANOVA = 分散分析、AUC = 曲線下面積、 ED_{50} = 50%効果用量、IP ＝ 腹腔内、ipGTT = 腹腔内投与グルコース負荷試験、SEM = 標準誤差、WT = 野生型
一晩絶食させた雄の正常（野生型）マウスにグルコースを 2 g/kg の用量で腹腔内投与した。グルコース負荷後 0～120 分の血糖値を測定し（A）、グルコース AUC の解析を行った（B）。媒体投与群のグルコース AUC に対する比率（%）から用量反応曲線を作成し、ED_{50} を算出した（C）。Tirzepatide は 0.01～100 nmol/kg の用量で、グルコース負荷の 17～18 時間前に皮下投与した。データは 1 群 7～8 例の平均値 ± SEM で示す。*p<0.05（一元配置 ANOVA 及び Dunnett の事後検定による媒体群との比較）。

図 2.6.2- 4　正常マウスを用いた ipGTT における tirzepatide の血糖コントロール改善作用

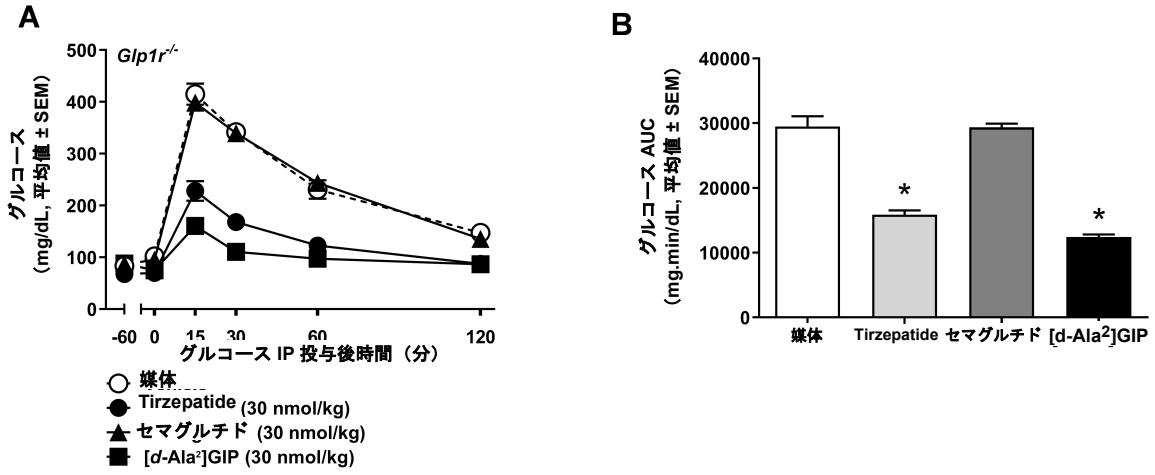
GIP 受容体 KO（*GIPr*$^{-/-}$）マウスを用いた ipGTT において、tirzepatide は単独投与により血糖コントロールを改善した。30 nmol/kg の用量で皮下投与したときの作用は GLP-1 受容体アゴニストであるセマグルチドと同程度であり、媒体群と比較して統計学的有意なグルコース AUC の低下が見られた。DPP-4 耐性 GIP アナログである[d-Ala^2]GIP を GIP 受容体 KO（*GIPr*$^{-/-}$）マウスに 30 nmol/kg の用量で投与したとき血糖コントロールの改善は認められなかった（図 2.6.2- 5）。



略語：ANOVA = 分散分析、AUC = 曲線下面積、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、ipGTT = 腹腔内投与グルコース負荷試験、KO = ノックアウト、SEM = 標準誤差
一晩絶食させた GIP 受容体 KO（*GIPr*$^{-/-}$）マウスにグルコースを 2 g/kg の用量で腹腔内投与し、グルコース負荷後 0～120 分の血糖値を測定し（A）、グルコース AUC の解析を行った（B）。Tirzepatide 及びセマグルチドはグルコース負荷の 17～18 時間前に 30 nmol/kg の用量で皮下投与、DPP-4 耐性 GIP アナログ[d-Ala^2]GIP はグルコース負荷の 1 時間前に 30 nmol/kg の用量で皮下投与した。データは 1 群 5 例の平均値 ± SEM で示す。*p<0.05（一元配置 ANOVA 及び Dunnett の事後検定による媒体群との比較）。

図 2.6.2- 5　GIP 受容体非存在下での ipGTT における tirzepatide の血糖コントロール改善作用

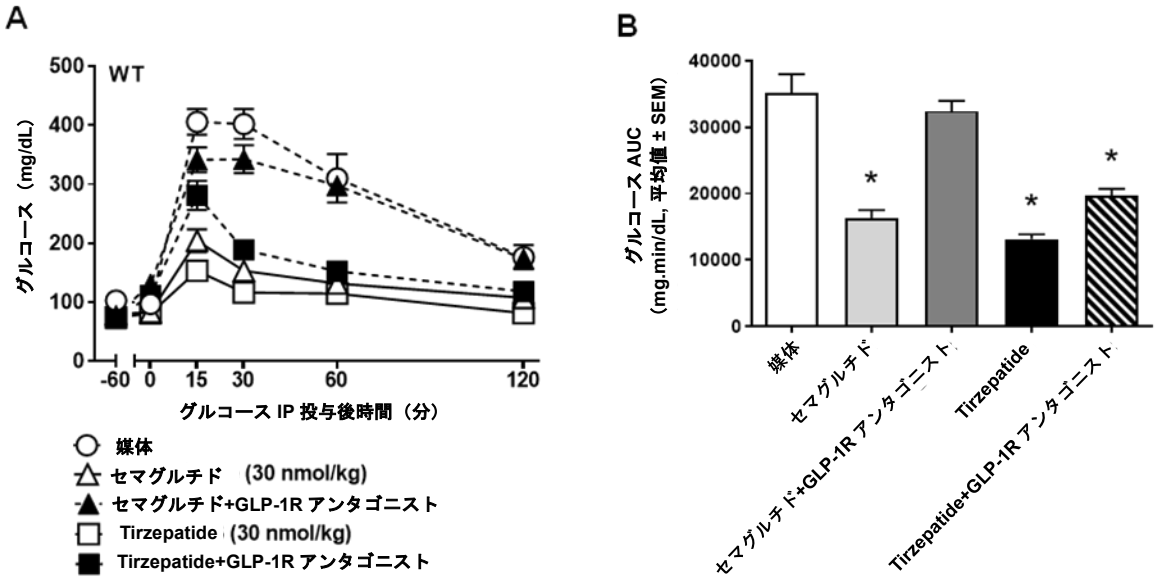
GLP-1 受容体 KO（*GLP-1r*$^{-/-}$）マウスを用いた ipGTT において、tirzepatide は単独投与により血糖コントロールを改善した。30 nmol/kg の用量で皮下投与したときの作用は DPP-4 耐性 GIP アナログ[d-Ala^2]GIP と同程度であり、媒体投与群と比較して統計学的有意差が認められた。GLP-1 受容体アゴニストであるセマグルチドを GLP-1 受容体 KO（*GLP-1r*$^{-/-}$）マウスに 30 nmol/kg の用量で投与したとき血糖コントロールの改善は認められなかった（図 2.6.2- 6）。



略語：ANOVA = 分散分析、AUC = 曲線下面積、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、KO = ノックアウト,IP = 腹腔内、ipGTT = 腹腔内投与グルコース負荷試験、SEM = 標準誤差
一晩絶食させた雄の GLP-1 受容体 KO（*GLP-1r* $^{-/-}$）マウスにグルコースを 2 g/kg の用量で腹腔内投与し、グルコース負荷後 0～120 分の血糖値を測定し（A）、グルコース AUC の解析を行った（B）。Tirzepatide 及びセマグルチドはグルコース負荷の 17～18 時間前に 30 nmol/kg の用量で皮下投与、DPP-4 耐性 GIP アナログ[d-Ala^2]GIP はグルコース負荷の 1 時間前に 30 nmol/kg の用量で皮下投与した。データは 1 群 5 例の平均値 ± SEM で示す。*p<0.05（一元配置 ANOVA 及び Dunnett の事後検定による媒体群との比較）。

図 2.6.2- 6　GLP-1 受容体非存在下での ipGTT における tirzepatide の血糖コントロール改善作用

正常マウスの GIP 受容体に対する tirzepatide の特異的な薬力学的作用を更に評価するため、正常マウスを用いた ipGTT において、tirzepatide 又はセマグルチド（グルコース負荷の 17～18 時間前に 30 nmol/kg の用量で投与）を単独又は GLP-1 受容体アンタゴニストである Jant-4（グルコース負荷の 1 時間前に 1000 nmol/kg の用量で投与）と併用投与した。その結果、GLP-1 受容体アンタゴニストによりセマグルチドのグルコース低下作用は減弱したが、tirzepatide の作用にはわずかな影響しか認められなかった（図 2.6.2- 7）。



略語：ANOVA = 分散分析、AUC = 曲線下面積、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、IP = 腹腔内、ipGTT = 腹腔内投与グルコース負荷試験、SEM = 標準誤差、WT = 野生型
一晩絶食させた雄の野生型マウスにグルコースを 2 g/kg の用量で腹腔内投与した。グルコース負荷後 0～120 分の血糖値を測定し（A）、グルコース AUC の解析を行った（B）。Tirzepatide（グルコース負荷の 17～18 時間前に 30 nmol/kg の用量で皮下投与）又はセマグルチド（グルコース負荷の 17～18 時間前に 30 nmol/kg の用量で皮下投与）は単独又は GLP-1 受容体アンタゴニスト Jant-4（グルコース負荷の 1 時間前に 1000 nmol/kg の用量で腹腔内投与）との併用で皮下投与した。データは 1 群 6 例の平均値 ± SEM で示す。*p<0.05（一元配置 ANOVA 及び Dunnett の事後検定による媒体群との比較）。

図 2.6.2- 7　GLP-1 受容体アンタゴニスト存在下の ipGTT における tirzepatide の血糖コントロール改善作用

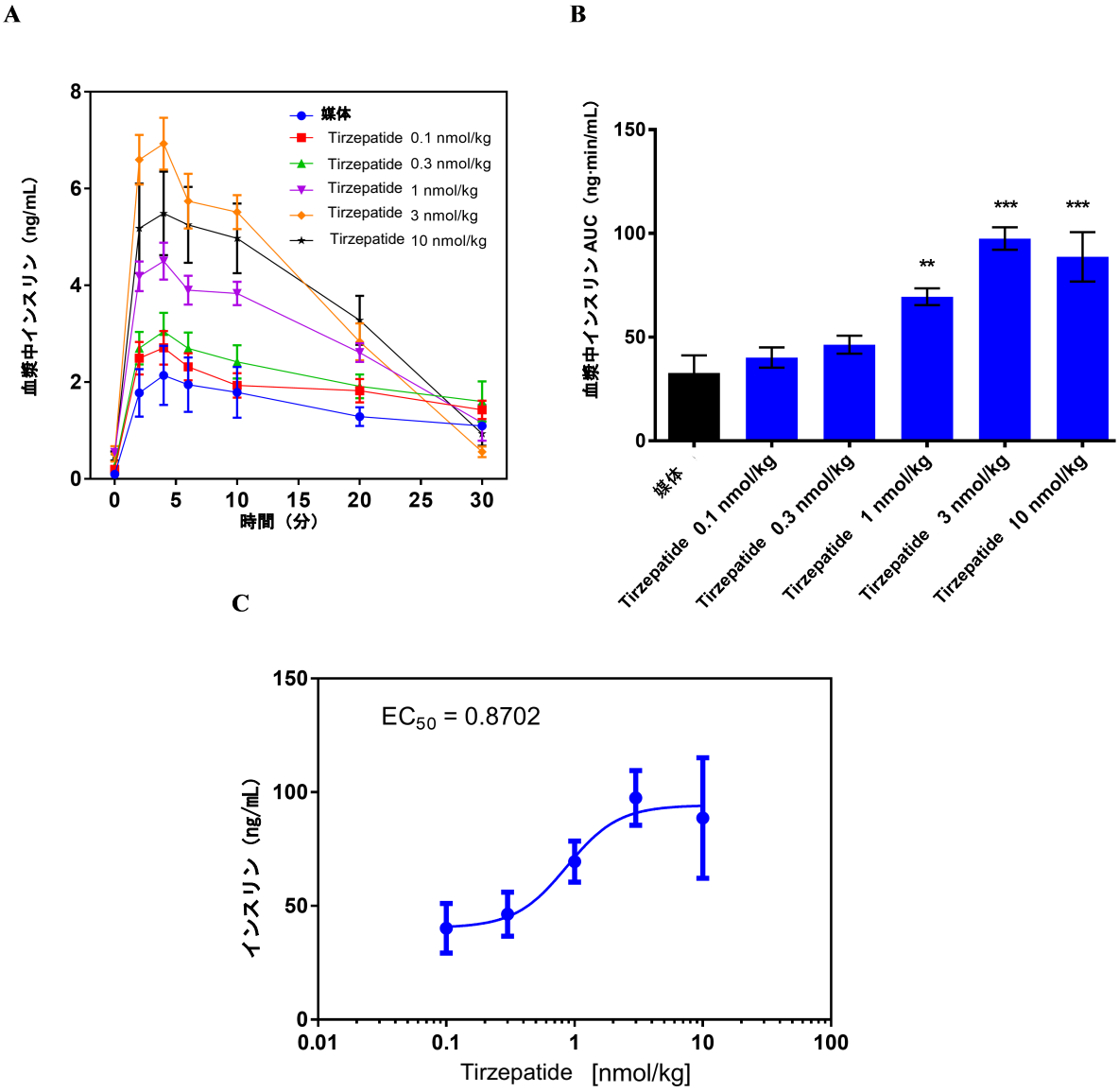
以上より、tirzepatide は GIP 受容体及び GLP-1 受容体の両方にアゴニストとして作用することにより血糖コントロールを改善することが示された。

2.6.2.2.2.2　インスリン分泌促進作用：ラットを用いた静脈内投与グルコース負荷試験（ivGTT）

（添付資料 4.2.1.1.10、DBT205 試験）

GIP 及び GLP-1 は食後のグルコース依存性インスリン分泌を促進するインクレチンホルモンである。ラットを用いた ivGTT で、tirzepatide を単回皮下投与したときのインスリン分泌促進作用を評価した。

雄 Wistar ラットを用いた ivGTT において、tirzepatide を 0.1、0.3、1、3 及び 10 nmol/kg の用量で単回皮下投与したとき、グルコース静脈内投与後のインスリン分泌が用量依存的に増加した。血漿中インスリン AUC（グルコース負荷後 0～30 分後までの AUC）の増加は tirzepatide 3 nmol/kg 投与時に最大となり（97.6 ± 5.4 ng•min/mL）、媒体群（32.7 ± 8.5 ng•min/mL）と比較して 198 ± 17%増加した（図 2.6.2- 8）。血漿中インスリン AUC 増加の ED_{50} 値は 0.87 nmol/kg であった。



略語：AUC = 曲線下面積、ED_{50} = 50%効果用量、ivGTT = 静脈内投与グルコース負荷試験、SEM = 標準誤差
一晩絶食した雄 Wistar ラットにグルコースを 0.5 mg/kg の用量で静脈内投与し、グルコース負荷後 0~30 分の血漿中インスリン濃度を測定し（A）、血漿中インスリン AUC の解析を行った（B）。用量反応曲線を作成し、ED_{50} を算出した（C）。Tirzepatide はグルコース負荷の 16 時間前に、0.1、0.3、1、3 及び 10 nmol/kg の用量で単回皮下投与した。データは 1 群 5 例の平均値 ±SEM を示す。
**p<0.01, ***p<0.001（一元配置 ANOVA 及び Dunnett 検定による媒体群との比較）。

図 2.6.2- 8　正常ラットを用いた ivGTT における tirzepatide のインスリン分泌促進作用

以上より、tirzepatide はグルコース依存性インスリン分泌を強力に促進することが示され、その ED_{50} は 0.87 nmol/kg であった。

2.6.2.2.2.3　インスリン感受性改善作用：インスリン抵抗性ラット及びマウスを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験

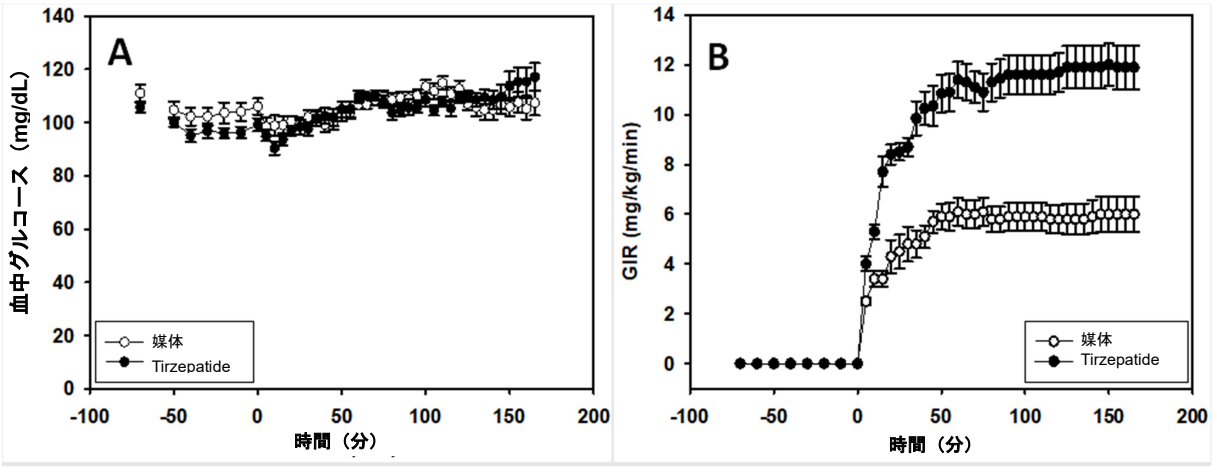
（添付資料 4.2.1.1.11、ENDO127 試験）
（添付資料 4.2.1.1.12、ENDO128 試験）
（添付資料 4.2.1.1.13、ENDO129 試験）

Tirzepatide は GIP 受容体及び GLP-1 受容体のデュアルアゴニストであり、主にインスリン分泌を促進することにより血中グルコースを低下させる。しかし、インスリン感受性をどの程度改善するかは明らかになっていない。食餌誘発性肥満（DIO）ラット（ENDO127 試験）及びマウス（ENDO128 試験）をインスリン抵抗性モデルとして、全身及び組織内インスリン感受性に対する tirzepatide の作用を高インスリン正常血糖クランプ法により評価した。

Long Evans 系 DIO ラットに tirzepatide（10 nmol/kg）を 1 日 1 回 14 日間反復皮下投与後、高インスリン正常血糖クランプ試験を実施した。動物は投与 13 日目から一晩絶食させた。正常血糖クランプ継続下で、血中グルコース濃度が定常状態にある条件下での組織へのグルコース取込み量を測定するため、クランプ試験（2 時間）終了時に、2-[1-^{14}C]-デオキシグルコース（2-[1-^{14}C]-deoxyglucose：2-DG）を動脈内ボーラス投与し、経時的に血液を採取して血液中の ^{14}C の消失速度を測定した。クランプ終了後に動物を屠殺して組織（ヒラメ筋、足底筋、精巣上体脂肪組織及び皮下脂肪組織）を採取し、組織中の 2-[1-^{14}C]-デオキシグルコースリン酸（2-[1-^{14}C]-deoxyglucose phosphate：2-DGP）を定量した。グルコースの取込み量（Rg）は以下の数式により算出した。

グルコース取込み量（Rg）＝［（組織内 2-DGP 濃度）／（血漿中 2-DG 濃度 - 時間曲線下面積）］×平均血漿中グルコース濃度

Tirzepatide のインスリン感受性改善作用は、全身グルコース利用率の変化を示すグルコース注入速度（GIR）、インスリンによる内因性グルコース産生（endogenous glucose production：EGP）、組織へのグルコース取込み及び血漿中トリグリセリドを指標として評価した。DIO ラットに tirzepatide を反復投与したとき、媒体群と比較して GIR が増加した（図 2.6.2- 9）。クランプ試験の後半 30 分間における平均 GIR は、媒体群（5.87 ± 0.54 mg/kg/min）に対し tirzepatide 群（11.67 ± 0.77 mg/kg/min）で統計学的有意差が認められ（$p<0.05$、改変 Kruskal-Wallis 検定及び Dunnett の事後検定）、インスリン感受性が改善したことが示された。

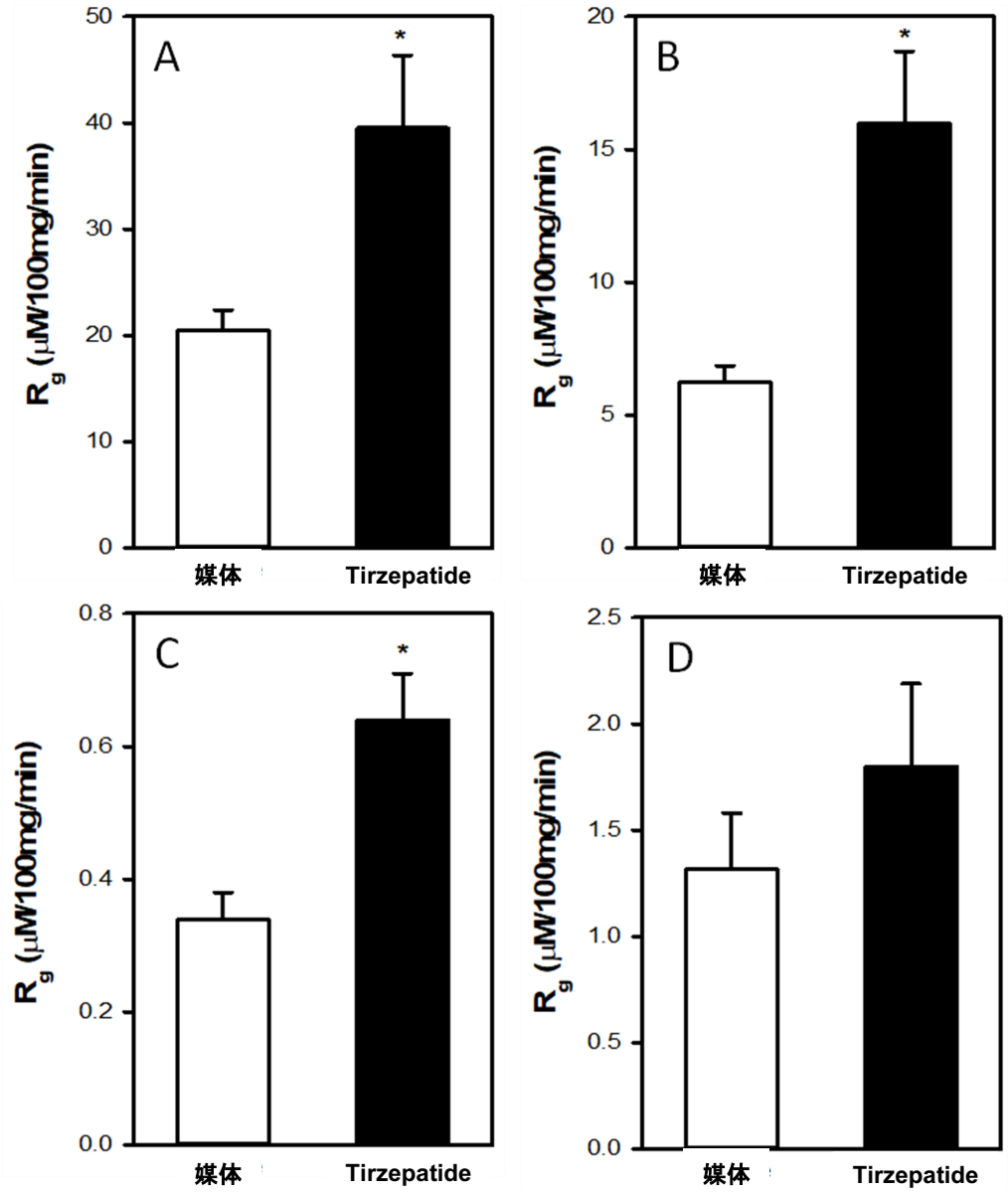


略語：GIR = グルコース注入速度、SEM = 標準誤差
データは 1 群 10 例の平均値 ± SEM で示す。

図 2.6.2- 9　食餌誘発性肥満 Long Evans ラット（インスリン抵抗性ラットモデル）を用いた高インスリン正常血糖クランプ試験における血中グルコース濃度（A）及びグルコース注入速度（B）

媒体群と tirzepatide 群で、クランプ開始前の EGP のベースライン値は同程度であった。Tirzepatide 群ではクランプ試験中の EGP は媒体群より低値である傾向が認められたことから、インスリン依存性 EGP 抑制の程度がより大きいことが示された。Tirzepatide 群では筋肉及び脂肪組織へのグルコース取込みが増加した（図 2.6.2- 10）。Tirzepatide の反復投与により、空腹時血漿中トリグリセリド（クランプ開始前）は低下した。対照群及び tirzepatide 群いずれにおいても、インスリンの作用によりクランプ期間中の血漿中トリグリセリド値はクランプ開始前より低下した。Tirzepatide 群の血漿中トリグリセリド値は、クランプ開始前及びクランプ期間中ともに媒体群より有意に低値を示し（$p<0.05$、改変 Kruskal-Wallis 検定及び Dunnett の事後検定）、tirzepatide 群では、クランプ期間中のインスリンによる血漿中トリグリセリド低下作用に改善が認められた。

以上のデータより、DIO ラットに tirzepatide を投与すると全身インスリン感受性が改善することが示された（ENDO127 試験）。



略語：SEM = 標準誤差、Rg = グルコース取込み量
（A）ヒラメ筋、（B）足底筋、（C）精巣上体脂肪組織及び（D）皮下脂肪組織。データは 1 群 10 例の平均値 ± SEM で示す。*p<0.05：改変 Kruskal-Wallis 検定及び Dunnett の事後検定による媒体群との比較。

図 2.6.2- 10　食餌誘発性肥満 Long Evans ラット（インスリン抵抗性ラットモデル）を用いた高インスリン正常血糖クランプ試験における組織へのグルコース取込み量

雄の C57BL/6 系 DIO マウスを用いた高インスリン正常グルコースクランプ試験においても tirzepatide は全身インスリン感受性を改善した。本試験では、tirzepatide によるインスリン感受性改善作用が体重に依存した変化であるかどうかを検証するため、tirzepatide を 3 nmol/kg 投与時のインスリン感受性に対する影響を、GLP-1 受容体アゴニストであるセマグルチドを同程度の体重減少が得られる用量（10 nmol/kg）で投与したときと比較した（n = 14～15／群）。また、1 日当たりの摂餌量を tirzepatide 3 nmol/kg 群と同じに調整した pair fed 群を設けた。薬剤を 1 日 1 回 14

日間反復皮下投与した結果、tirzepatide 群、セマグルチド群及び pair-fed 群の体重減少に差は認められなかった。14 日間の投与終了後に実施した高インスリン正常血糖クランプ試験において、体重減少が同程度であったにもかかわらず、tirzepatide は、セマグルチド群及び pair-fed 群と比較し有意に GIR を増加させた（$p<0.05$、改変 Krushal-Wallis 検定及び Bonferroni の多重比較検定）。（ENDO128 試験）

また、GLP-1 受容体が欠損したトランスジェニックマウスに tirzepatide を 14 日間投与した場合、体重減少は生じないが、高インスリン正常血糖クランプ試験においてインスリン感受性を改善（GIR が増加）したことが報告されている（Samms et al. 2021）。

以上より、DIO マウスに tirzepatide を投与すると全身インスリン感受性が改善することが示された。さらに、tirzepatide は体重減少が同程度の pair-fed 群及び GLP-1 受容体アゴニスト群と比較して GIP を増加させたことから、tirzepatide のインスリン感受性改善作用には、体重に非依存的な機序が寄与している可能性が示唆された。

第 IIb 相臨床試験において、tirzepatide により、HOMA2-IR 指数及び空腹時インスリンの減少並びにアディポネクチン、IGFBP1 及び IGFBP2 の増加を指標とするインスリン感受性マーカーの改善が認められた（Thomas et al. 2021）。また第 IIb 相臨床試験において、分岐鎖アミノ酸（BCAA）であるバリン、ロイシン及びイソロイシンの循環血中濃度が有意に低下することが示された（Pirro et al. 2020）。BCAA は、肝臓及び筋肉への脂質の蓄積及び心肥大の促進を示唆するインスリン抵抗性のバイオマーカーとして認識されつつある（Yoneshiro et al.2019）。褐色脂肪組織（BAT）における BCAA 異化の調節不全により循環血中濃度が上昇する可能性が報告されている。BAT は、BCAA などの循環血中代謝物を低下させる能力を有する代謝的に活発な組織である。BAT 特異的な調節不全は、BCAA 異化酵素の発現の低下及びそれに続く全身インスリン抵抗性の発現によって生じると考えられている。（Yoneshiro et al.2019）

DIO マウス（n = 6 例／群）を用いて、血漿中及び BAT 内の BCAA 及び関連代謝物濃度に対する tirzepatide の作用を検討した（ENDO129 試験）。Tirzepatide を 1 日 1 回 14 日間皮下投与したとき、10 nmol/kg 群では血漿中の BCAA 並びに異化産物であるグルタミン酸及びケトロイシン濃度が媒体群と比較して統計学的有意に低下した。ケトイソロイシン濃度は媒体群よりも低く、その変化は有意に近いものであった（$p = 0.07$）。ケトバリンは検出されなかった。また BAT 中では、BCAA 異化の最初の産物であるグルタミン酸の有意な上昇も認められたことから、BCAA 異化経路が組織内で活性化していることが示された。Tirzepatide の 3 nmol/kg 群における血漿中 BCAA 及び関連代謝物濃度は媒体群より低かったが、統計学的有意な低下が認められたのはイソロイシン及びバリンのみであった。ロイシン濃度の変化は有意に近いものであった（表 2.6.2-12）。

以上より、tirzepatide の全身インスリン感受性改善作用の機序として、BAT における BCAA の異化経路の活性化が少なくとも部分的に寄与している可能性が示された（ENDO129 試験）。

表 2.6.2-12.　血漿中及び褐色脂肪組織中の BCAA、グルタミン酸及び BCKA 濃度に対する tirzepatide の作用

	血漿		BAT	
代謝物	**3 nmol/kg**	**10 nmol/kg**	**3 nmol/kg**	**10 nmol/kg**
グルタミン酸	1.00	0.75*	4.05*	2.81*
イソロイシン	0.74*	0.70*	1.90*	1.93*
ロイシン	0.80 （p = 0.07）	0.77*	1.87*	1.90*
バリン	0.77*	0.76*	1.78*	1.83*
ケトイソロイシン	0.71	0.67	n.a.	n.a.
ケトロイシン	0.75	0.66*	n.a.	n.a.
ケトバリン	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.

略語：ANOVA = 分散分析、BAT = 褐色脂肪組織、BCAA = 分岐鎖アミノ酸、BCKA = 分岐鎖ケト酸、n.a. = 該当なし（BAT 内 BCKA は検体の量が不十分であったため測定しなかった）、n.d. = 検出されず。
データは媒体群に対する倍数変化で表す。*未調整 p 値≤0.05（一元配置 ANOVA による媒体群との比較）。媒体群と tirzepatide 群ともに、血漿検体数（n = 5）及び BAT 検体数（n = 6）。

2.6.2.2.2.4　胃内容排出抑制作用

（添付資料 4.2.1.1.14、DBT207 試験）

（添付資料 4.2.1.1.16、Urva et al. 2020）

胃内容排出（GE）は、食後血糖及び摂食に影響を及ぼす重要な因子の 1 つであり、胃、腸及び中枢神経並びにホルモンの相互作用による複雑なメカニズムが関与する（Goyal et al. 2019）。GE における GLP-1 の役割はよく知られているが（Camilleri 2019）、GIP の作用に関する報告は限定的で、食後の血中 GIP 濃度に近い濃度の天然型 GIP 及び GIP 受容体アゴニストは、GE に対して明らかな作用を示さないことが報告されている（Meier et al. 2004;Nauck et al. 2004）。

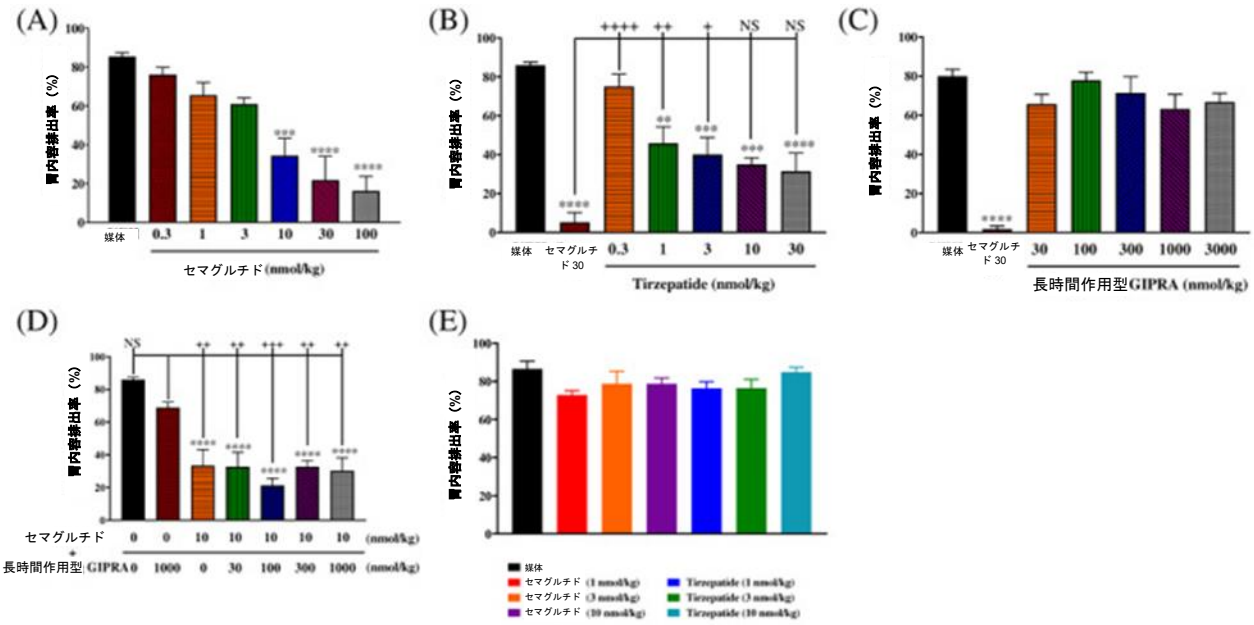
DIO マウスを約 16 時間絶食後に半流動食 0.5 mL（0.5 g）を強制経口投与した。半流動食投与後は、食物が希釈されるのを防ぐために絶水させた。半流動食投与 2 時間後にマウスを安楽殺し、幽門部及び噴門部を結紮して胃を摘出し、重量を測定した。続いて胃内容物を洗浄除去して再び重量を測定し、洗浄前との重量差を胃内残存食物量とし、GE 率（投与食物量に対する胃内残存食物量の比率）を算出した。

まず、GE に対する tirzepatide の作用及び用量反応性を検討した（DBT207 試験）。Tirzepatide は半流動食投与の 4 時間前に 3、10、30 又は 100 nmol/kg の用量で皮下投与した（n = 4～5／群）。その結果、tirzepatide は 10 nmol/kg 以上の用量で媒体群と比較して統計学的有意に GE を抑制し（p<0.05、一元配置 ANOVA 及び Dunnet 検定）、GE 率は 10 nmol/kg で最大となった。10、30 及び 100 nmol/kg 群の GE 率には 差が認められたが、いずれの群でも媒体群と比較して統計学的有意な抑制が認められて おり、この差は in vivo 試験のばらつきの範囲であると考えられた。後述の試験（Ulva et al.2020）では、チルゼパチドはより明確に用量依存的な GE 抑制作用を示し、10 nmol/kg 以上で最大効果が認められた（図 2.6.2- 11 パネル B）。

次に、tirzepatide、GLP-1 受容体アゴニストであるセマグルチド及び長時間作用型 GIP 受容体アゴニストを単独又は併用投与時の GE に対する作用を検討した。雄の C57/Bl6 系 DIO マウス（24～26 週齢）に、半流動食投与の約 16 時間前に、媒体（40 mM Tris-HCl 緩衝液、pH 8.0）、セマグ

ルチド（0.3、1、3、10、30 又は 100 nmol/kg）、tirzepatide（0.3、1、3、10 又は 30 nmol/kg）又は長時間作用型 GIP 受容体アゴニスト（30、100、300、1000 又は 3000 nmol/kg）を単独で用量漸増皮下投与、又は長時間作用型 GIP 受容体アゴニスト（30、100、300 又は 1000 nmol/kg）を有効用量のセマグルチド（10 nmol/kg）と併用で用量漸増皮下投与した。その結果、セマグルチド単独投与（図 2.6.2- 11、パネル A）及び tirzepatide 単独投与（図 2.6.2- 11、パネル B）により GE が抑制されたが、長時間作用型 GIP 受容体アゴニストの単独投与による GE への影響は認められなかった（図 2.6.2- 11、パネル C）。長時間作用型 GIP 受容体アゴニストと固定用量のセマグルチドを併用投与したとき、セマグルチドによる GE 抑制に対する更なる影響は認められなかったことから、GLP-1 が GE 抑制の主な誘発因子であることが示された（図 2.6.2- 11、パネル D）。

さらに、肥満マウスを用いて tirzepatide を反復投与したときの GE への影響も評価した。Tirzepatide（1、3 及び 10 nmol/kg）又はセマグルチド（1、3 及び 10 nmol/kg）を 1 日 1 回 14 日間反復皮下投与した後、約 16 時間絶食後に半流動食を投与し、GE 率を評価した。その結果、セマグルチド又は tirzepatide の反復投与による GE の抑制は認められず（図 2.6.2- 11、パネル E）、単回投与で認められた GE 抑制作用が反復投与により消失することが確認され、マウスにおいて GE に対する作用にタキフィラキシーが生じることが示された（Urva et al. 2020）。



略語：ANOVA = 分散分析、GE = 胃内容排出、GIP = グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド、GLP-1 = グルカゴン様ペプチド-1、NS = 有意差なし、SEM = 標準誤差
（A）セマグルチド単回投与による GE の変化、（B）tirzepatide 単回投与による GE の変化、（C）長時間作用型 GIP 受容体アゴニスト単回投与による GE の変化、（D）漸増用量の長時間作用型 GIP 受容体アゴニストと固定用量のセマグルチドとの単回併用投与による GE の変化、（E）セマグルチド又は tirzepatide の反復皮下投与による GE の変化。データは 1 群 5 例の平均値 ± SEM で示す。+ $p<0.05$、++ $p\leq0.01$、+++ $p\leq0.001$ 及び++++ $p\leq0.0001$（セマグルチドとの比較）、* $p<0.05$、** $p\leq0.01$、*** $p\leq0.001$ 及び**** $p\leq0.0001$（媒体との比較）。一元配置 ANOVA 及び Tukey 検定。

図 2.6.2- 11　肥満マウスの胃内容排泄に対する GIP 及び GLP-1 の作用

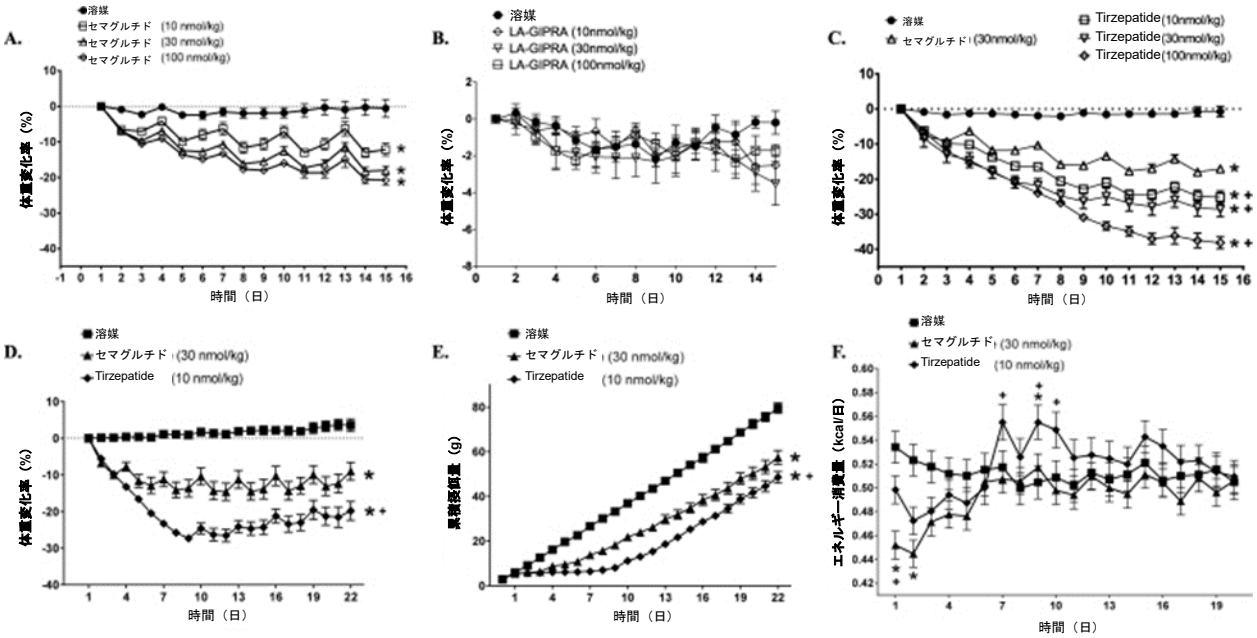
2.6.2.2.2.5　肥満マウスにおける tirzepatide の体重減少作用

（添付資料 4.2.1.1.15、DBT206 試験）（添付資料 4.2.1.1.17，Coskun et al. 2018）

肥満マウスの体重及び摂餌量に対する tirzepatide の作用を検討した。

雄 C57/Bl6 系 DIO マウスに tirzepatide（10、30 又は 100 nmol/kg）、GLP-1 受容体アゴニストであるセマグルチド（10、30 又は 100 nmol/kg）又は長時間作用型 GIP 受容体アゴニスト（10、30 又は 100 nmol/kg）を 3 日に 1 回の頻度で 15 日間反復皮下投与し、体重への影響及び用量相関性を評価した（図 2.6.2- 12、パネル A‐C）。また脂肪量、血漿中コレステロール値及び肝臓組織中のトリグリセリドを測定した。その結果、tirzepatide（10、30 又は 100 nmol/kg）群では、統計学的有意かつ用量依存的な体重減少が認められ、ED_{50} は 5 nmol/kg であった。体重減少は主に脂肪量の減少によるものであった。また血漿中総コレステロール値及び肝臓組織中トリグリセリド量が用量依存的に減少した（それぞれ媒体群と比較して最大 50%超及び 65%超の減少）。セマグルチド群では主に脂肪量の減少による体重減少が用量関連性に認められ、その効果は 30 nmol/kg で最大に達した（図 2.6.2- 12、パネル A）。Tirzepatide による体重減少はセマグルチドよりも顕著で（図 2.6.2- 12、パネル C 及び D）、すべての tirzepatide 投与群でセマグルチド 30 nmol/kg 群との比較で統計学的有意差が認められた。長時間作用型 GIP 受容体アゴニスト投与群では、体重及び体組成への影響は認められなかったが（図 2.6.2- 12、パネル B）、検討したすべての用量で空腹時血中グルコース濃度が低下した（Coskun et al. 2018）。

DIO 雄性 C57/Bl6 マウスに tirzepatide（10 nmol/kg）又はセマグルチド（30 nmol/kg）を 3 日に 1 回の頻度で 22 日間反復皮下投与し、体重、摂餌量及びエネルギー消費量への影響を評価した（パネル D‐F）。その結果、tirzepatide 群では、投与開始後 7～10 日間の間に、持続的に顕著な摂餌量の減少が認められ（図 2.6.2- 12、パネル E）、その結果としてより多くの脂肪の酸化が生じたと考えられた。また tirzepatide 群では投与 7 日目以降に、軽度ではあるものの統計学的に有意なエネルギー消費量の増加が認められ（図 2.6.2- 12、パネル F）、観察期間後半の持続的な体重減少に寄与していたと考えられる（Coskun et al. 2018）。セマグルチド投与群ではエネルギー消費量の明らかな増加は認められなかった。



略語：ANOVA = 分散分析、DIO = 食餌誘発性肥満、LA-GIPRA = 長時間作用型 GIP 受容体アゴニスト、SEM =標準誤差
DIO マウスの試験開始時の体重は約 45 g であった。パネル A-C：DIO マウスにセマグルチド（A）、LA-GIP 受容体アゴニスト（B）又は tirzepatide（C）を 3 日に 1 回の頻度で 15 日間皮下投与したときの体重変化率。パネル D-F：Tirzepatide（♦）又はセマグルチド（▲）を 3 日に 1 回の頻度で 22 日間投与したときの体重変化率（D）、累積摂餌量（E）及びエネルギー消費量（F）。体重及び摂餌量については $p<0.05$［一元配置反復測定 ANOVA による媒体群（⋆）又はセマグルチド群（+）との比較］。エネルギー消費量のデータは、各群について体重で調整した最小二乗平均値の経時的変化で示す。$p<0.05$［ANCOVA による媒体群（⋆）又はセマグルチド群（+）との比較］。データは 1 群 5～6 例の平均値 ± SEM で示す。

図 2.6.2- 12　肥満マウスの体重、摂餌量及びエネルギー消費量への影響

以上より、tirzepatide は反復投与により DIO マウスの体重を減少させ、GLP-1 受容体アゴニストよりも高い体重減少効果を示した。Tirzepatide の体重減少作用には持続的な摂餌量減少及びエネルギー消費量の増加が寄与していると考えられた。

2.6.2.3　副次的薬理試験

Tirzepatide の副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4　安全性薬理試験

安全性薬理試験は、医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation：ICH）のガイドライン（ICH S7）及び「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）」に従って実施した。一部の試験項目（被験物質の特性検討など）は、GLP 基準を完全に満たしていないが、GLP の原則に従って実施しており、試験報告書には「例外的に GLP 適用で実施しなかったことによる試験の完全性、解釈及び結論への影響はなかった」と記載されている。

ICH S6 (R1) に準じて、呼吸系及び CNS 系に関する非臨床安全性薬理評価はカニクイザルを用いた tirzepatide の 1 ヵ月間反復投与毒性試験で行った（8325823 試験）。心血管系に関する非臨床安全性薬理評価は、GLP-1 受容体アゴニストの心血管系に対する影響が報告されていること（Goodwill et al. 2014）から、独立した安全性薬理試験（8323700 試験）を実施し、また、1 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験（それぞれ 8325823 試験及び 8336517 試験）においても血行動態パラメータ及び QT/QTc 間隔延長誘発リスクを評価した。他の GLP-1 受容体アゴニストで報告された心血管系の影響にサルが感受性を有することが示されているため、心血管系に対する tirzepatide の影響の評価にはサルを用いた。さらに、hERG アッセイでも tirzepatide の評価を行った。

2.6.2.4.1　心血管系に関する試験

2.6.2.4.1.1　単回投与安全性薬理試験

（添付資料 4.2.1.3.2、8323700 試験）

雄のテレメーター装着カニクイザルを用いた単回投与安全性薬理試験において、心血管系に対する tirzepatide の影響の有無を並行投与デザインで評価した。1 群雄 6 例のサルに 0、0.05 及び 0.15 mg/kg の用量で tirzepatide を 0.1 mL/kg の容量で単回皮下投与した。心血管系機能の評価は、血行動態［最大左室圧上昇速度（maximal rate of rise of left ventricular pressure : dP/dt_{max}）、収縮期、拡張期及び平均血圧並びに脈圧］及び心電図パラメータ（QT 及び QTc 間隔）に基づいて行った。テレメトリーデータの共変量調整及び QTc 間隔の算出のため、投与前期間中 25 時間以上にわたり連続してテレメトリーデータを測定した。投与期間中は、投与の 2.5 時間以上前から投与 97 時間後まで連続してテレメトリーデータを測定した。全身の健康状態の評価を、一般状態及び体重に基づいて行った。投与 5 日後の最終データ測定後に、すべての動物をストック集団に戻した。

Tirzepatide を 0.15 mg/kg の用量で単回投与したとき、摂餌量減少及び軽度の体重減少が一部の個体で認められた。Tirzepatide に直接関連する心電図パラメータの変化は認められなかった。Tirzepatide を 0.05 mg/kg 以上の用量で投与したとき QT 間隔短縮が認められたが、QT 間隔を心拍数で補正する（QTc 間隔）と変化は消失したことから、QT 間隔の変化は心拍数増加による二次的な変化であり、tirzepatide に直接関連するものではないと考えられた。Tirzepatide 投与に起因する心電図波形異常及び不整脈は認められなかった。Tirzepatide に関連する血行動態の変化は、0.05 mg/kg 以上の群における心拍数増加及び dP/dt_{max} 減少並びに 0.15 mg/kg 群における拡張期及び平均血圧の上昇並びに脈圧低下であった。0.15 mg/kg 群の拡張期血圧は対照群よりも最大 8 mmHg（11%）高く、有意差はすべて暗期（投与 9 時間後に開始）で認められた。0.15 mg/kg 群の平均血圧の変化［対照群との比較で最大 9 mmHg（10%）上昇］は、概して拡張期血圧の変化に一致していた。収縮期血圧には tirzepatide に関連する変化は認められなかったが、脈圧は 0.15 mg/kg 群で低下［対照群との比較で最大 4 mmHg（11%）低下］し、拡張期血圧の上昇と相関していた。Tirzepatide に関連する心拍数及び dP/dt_{max} の変化が 0.05 mg/kg 以上の群で認められた。拡張期血圧の変化が暗期に多く認められたこととは対照的に、心拍数の増加は明期により顕著に認められた。心拍数は 0.05 及び 0.15 mg/kg 群でそれぞれ対照群よりも最大 21 及び 27 bpm（それぞれ 18 及び 23%）増加した。dP/dt_{max} は 0.05 mg/kg 群で対照群よりも最大 592 mmHg/秒（22%）、0.15 mg/kg 群で対照群よりも最大 608 mmHg/秒（18%）減少した。dP/dt_{max} は収縮性の間接的な指

標であり、心室の負荷状態の影響を受ける。心拍数及び血圧に認められた変化を考慮すると、dP/dt_{max} の変化は予想される変化と考えられた。

以上、最低用量（0.05 mg/kg）で心拍数増加及び dP/dt_{max} 減少が認められたことから、本試験における無影響量（no-observed-effect level：NOEL）は 0.05 mg/kg 未満であった。

2.6.2.4.1.2　反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.4、8325823 試験）

（添付資料 4.2.3.2.5、8336517 試験）

カニクイザルを用いた 1 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験で心血管系評価項目の測定も行った。定量的心電図測定として、心拍数、QT 間隔及び Bazett 補正 QT 間隔の測定を行った。

1 ヵ月間反復投与毒性試験（8325823 試験）では tirzepatide を 0、0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg の用量で週 1 回の頻度で投与し、体外ジャケット式テレメトリーを用いて無麻酔動物の心電図を、投与前期間中に 1 回並びに投与期間の 8 及び 22 日目に測定した。

その結果、投与期間の 8 及び 22 日目の暗期（投与 8～19 時間後）において、心拍数の増加傾向が、tirzepatide の 0.15 mg/kg 群（対照群との比較で最大 20 bpm、18%）及び 0.5 mg/kg 群（対照群との比較で最大 24 bpm、22%）の雄で認められた。心拍数増加は統計学的に有意なものではなく、暗期のみに認められたが、変化に用量依存性が認められたため、tirzepatide に起因する変化と考えられた。0.05 mg/kg 群の雄並びに 0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg 群の雌には、投与期間の 8 及び 22 日目に、tirzepatide に関連する心拍数の変化は認められなかった。0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg 群において、投与期間の 8 及び 22 日目に、tirzepatide に関連する PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc 間隔の変化は認められなかった。定性的心電図評価において、tirzepatide に起因する心電図の波形異常及び質的変化は認められなかった。

以上、0.15 及び 0.5 mg/kg 群で心拍数増加が認められたことから、本試験における心血管系に及ぼす影響に関する NOEL は 0.05 mg/kg であった。

6 ヵ月間反復投与毒性試験（8336517 試験）では tirzepatide を 0、0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg の用量で週 1 回の頻度で投与し、体外ジャケット式テレメトリーを用いて無麻酔動物の心電図を、投与前期間中に 1 回並びに投与期間の 8、78 及び 169 日目に測定した。

その結果、tirzepatide を 0.15 又は 0.5 mg/kg の用量で投与したとき、投与期間の 8、78 又は 169 日目の主に暗期（投与 8～19 時間後）において、心拍数の増加が認められた。0.15 及び 0.5 mg/kg 群における心拍数の最大変化は、対照群との比較でそれぞれ 19 bpm（18%）及び 31 bpm（30%）であった。0.05 mg/kg 群では、8、78 及び 169 日目に、tirzepatide に関連する心拍数の変化は認められなかった。Tirzepatide に関連する心拍数の増加により QT 間隔の変化が認められたが、これは心拍数の変化による二次的なものと考えられた。0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg 群において、8、78 及び 169 日目に、tirzepatide に関連する PR 間隔、QTc 間隔及び QRS 時間の変化は認められなかった。定性的心電図評価の一部として実施した評価において、投与期間の 8、78 及び 169 日目に、tirzepatide に起因する心電図の波形異常及び質的変化は認められなかった。

以上、0.15 及び 0.5 mg/kg 群で心拍数増加が認められたことから、本試験における心血管系に及ぼす影響に関する NOEL は 0.05 mg/kg であった。

2.6.2.4.1.3 hERG アッセイ

（添付資料 4.2.1.3.1、180917.FMD 試験）

不整脈誘発リスクを評価するため、hERG チャネル電流に対する tirzepatide の in vitro での影響を評価した。

その結果、tirzepatide による hERG 電流の阻害率（平均値 ± 標準誤差、n = 3）は 30 及び 300 μM でそれぞれ 1.5 ± 0.5%及び 2.6 ± 0.3%であった。これらの阻害作用は媒体対照群の作用（1.9 ± 0.3%、n = 3）と比較して、統計学的に有意（$p<0.05$）ではなかった。検討した最高濃度での阻害率が 50%を超えなかったため、hERG カリウム電流に対する tirzepatide の阻害作用の IC_{50} 値は算出できなかったが、300 μM よりも高値と推定された。

2.6.2.4.2 中枢神経系に関する試験

（添付資料 4.2.3.2.4、8325823 試験）

カニクイザルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験に神経学的検査及び体温測定を組み込んだ。覚醒下での神経学的検査を、投与前期間中に 1 回、投与期間の 1 日目の投与の約 2、12、48、96 及び 144 時間後並びに 29 日目の投与前及び投与の約 12 時間後に実施した。神経学的検査後に直腸温を測定した。

その結果、tirzepatide に関連する神経学的所見及び体温変化は認められず、CNS 系に及ぼす影響に関する NOEL は最高用量の 0.5 mg/kg であった。

2.6.2.4.3 呼吸系に関する試験

（添付資料 4.2.3.2.4、8325823 試験）

カニクイザルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験に呼吸検査を組み込んだ。呼吸数の測定を、投与前に 1 回、1 日目の投与の約 2、12、48、96 及び 144 時間後並びに 29 日目の投与前及び投与の約 12 時間後に実施した。ケージ外からの観察により呼吸数の測定及び定性的呼吸評価を実施した。呼吸検査を他の検査と組み合わせて実施する場合は、呼吸検査を最初に実施した。

その結果、呼吸数及び定性的呼吸評価において tirzepatide に関連する変化は認められず、呼吸系に及ぼす影響に関する NOEL は最高用量の 0.5 mg/kg であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

Tirzepatide の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける一連の試験において、tirzepatide の in vitro 及び in vivo 作用を評価した。

In vitro 試験の結果、tirzepatide は GLP-1 受容体及び GIP 受容体の強力なデュアルアゴニストであることが示された。Tirzepatide の両受容体に対する親和性及びアゴニスト活性を天然型リガンドと比較した比活性に基づくと、tirzepatide は GLP-1 受容体よりも GIP 受容体に高い親和性及び効力を示す不均衡な活性を有することが示された（CTD 第 2.6.2.2.1.1 項～2.6.2.2.1.4 項）。また、GLP-1 受容体において、[^{35}S]GTPγS 結合アッセイで tirzepatide の E_{max} 値は天然型 GLP-1 の約 50%

であり、GLP-1 受容体の部分アゴニストであることが示された（CTD 第 2.6.2.2.1.4 項）。Tirzepatide は GLP-1 受容体において、cAMP シグナル伝達経路に対する強い効力を示す一方（CTD 第 2.6.2.2.1.3 及び 2.6.2.2.1.4 項）、天然型 GLP-1 とは異なり β アレスチン動員作用を示さず（CTD 第 2.6.2.2.1.5 項）、受容体内在化刺激作用も天然型 GLP-1 より弱かった（CTD 第 2.6.2.2.1.6 項）。これは GPCR 内在化がエンドソーム輸送機構のアレスチン動員を介して生じるという報告に一致していた（Marchese et al. 2008）。これらの結果より、tirzepatide は β アレスチン動員より、c-AMP 経路を優位に活性化するバイアス型アゴニストであることが示された。この両経路に対する作用の違いは、GLP-1 受容体の輸送に影響し、その結果 cAMP 経路を介した作用の増強する可能性が考えられた（Willard et al. 2020）。同様の選択性を持つ GLP-1 受容体のバイアス型アゴニストは、非バイアス型アゴニストと比較して、マウスでの血糖コントロール及び体重減少作用を強く発現することが報告されている（Jones et al.2018; Lucey et al.2020）。単離膵島を用いた試験において、tirzepatide は GIP 受容体又は GLP-1 受容体いずれか一方を発現した膵島においてもインスリン分泌を促進することが in vitro 試験において示された（CTD 第 2.6.2.2.1.7 項）。

In vivo 試験の結果、tirzepatide は GIP 及び GLP-1 両受容体を介して血糖コントロールを改善することが示された（CTD 第 2.6.2.2.2.1 項）。Tirzepatide は DIO ラット及びマウスを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験において GIR 及び組織（骨格筋、脂肪組織）へのグルコース取込みを増加させ、体重依存的及び非依存的な機序により全身インスリン感受性を改善することが示された（CTD 第 2.6.2.2.2.3 項）。DIO マウスを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験では、体重減少が同程度の pair-fed 群及びセマグルチド群と比較して優れたインスリン感受性改善作用を示したことから、tirzepatide によるインスリン感受性改善作用には、体重非依存的な機序が寄与しており（CTD 第 2.6.2.2.2.3 項）、GIR 増加の約 30%が体重非依存的な機序に起因すると考えられた（Samms et al. 2021）。Tirzepatide は、GLP-1 受容体が欠損したトランスジェニックマウスを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験においてもインスリン感受性を改善したことが報告されている（Samms et al. 2021）。Tirzepatide は DIO マウスにおいて GLP-1 受容体アゴニストよりも高い体重減少効果を示し、これには持続的な摂餌量減少に加え、エネルギー消費量の増加が寄与していると考えられた（CTD 第 2.6.2.2.2.5 項）。

以上の効力を裏付ける試験の結果より、tirzepatide は GIP 及び GLP-1 両受容体を活性化し、β 細胞からのグルコース依存性インスリン分泌を促進し、体重を減少させ、体重依存的及び非依存的機序により全身インスリン感受性を改善させることにより、血糖コントロールを改善することが示された。

サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験において、tirzepatide は 0.5 mg/kg までの用量で呼吸系及び CNS 機能に明らかな影響を示さなかった。しかしながら、動物で報告されている GLP-1 受容体アゴニストの心血管系に対する薬理作用（Goodwill et al. 2014）に一致して、サルに tirzepatide を単回皮下投与したとき、検討した両用量（0.05 及び 0.15 mg/kg）で、血圧上昇（高用量の 0.15 mg/kg のみ）、心拍数増加及び心収縮性減少が認められた。dP/dt_{max} は収縮性の間接的な指標であり、心室の負荷状態に依存するため、心拍数及び血圧に認められた変化を考慮すると、dP/dt_{max} の変化は予想されるものと考えられる。心拍数はサルを用いた 1 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験でも増加した。サルに単回投与したとき又は 1 もしくは 6 ヵ月間反復投与毒性試験で反

復投与したとき、いずれの用量においても QTc 間隔の変化は認められなかった。Tirzepatide は、検討した最高濃度（300 μM）において、媒体陰性対照と比較して hERG 電流を阻害しなかったことから、不整脈誘発リスクは低いとの予想が裏付けられた。

2.6.2.7　図表

図表は適切な項に記載する。

2.6.2.8　参考文献

Camilleri M. Gastrointestinal hormones and regulation of gastric emptying. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2019;26(1):3-10.

Coskun, T. Sloop KW, Loghin C, Alsina-Fernandez J, Urva S, Bokvist KB, et al. LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus: From discovery to clinical proof of concept. *Mol Metab*. 2018;Dec,18:3-14.

Gabe MBN, Sparre-Ulrich AH, Pedersen MF, et al. Human GIP(3-30)NH_2 inhibits G protein-dependent as well as G protein-independent signaling and is selective for the GIP receptor with high-affinity binding to primate but not rodent GIP receptors. *Biochem Pharmacol*. 2018;150:97-107.

Goodwill AG, Mather KJ, Conteh AM, Sassoon DJ, Noblet JN, Tune JD. Cardiovascular and hemodynamic effects of glucagon-like peptide-1. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15:209-217.

Goyal RK, Guo Y, Mashimo H. Advances in the physiology of gastric emptying. *Neurogastroenterol Motil*. 2019;31(4):e13546.

Harrison C, Traynor JR. The [35S]GTP gamma S binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci*. 2003;74(4):489-508.

J Jones B, Buenaventura T, Kanda N, Chabosseau P, Owen BM, Scott R, et al. Targeting GLP-1 receptor trafficking to improve agonist efficacy. *Nat Commun.* 2018;Apr 23,9(1):1602.

Lucey M, Pickford P, Bitsi S, Minnion J, Ungewiss J, Schoeneberg K, et al. Disconnect between signalling potency and in vivo efficacy of pharmacokinetically optimised biased glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Mol Metab*. 2020;Jul,37:100991.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of β-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J of Cell Sci*. 2002;115:455-465.

Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:601-629.

Meier JJ, Goetze O, Anstipp J, Hagemann D, Holst JJ, Schmidt WE, et al. Gastric inhibitory polypeptide does not inhibit gastric emptying in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;Apr,286(4):E621-625.

Nauck MA, Baller B, Meier JJ. Gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(Suppl 3):S190-S196.

Pirro V, Willency JA, Wilson JM, Roth KD, Lin Y, Collins KAL, et al. Effects of tirzepatide, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist, on metabolic profile in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2020;63(Suppl 1):S73.

Samms RJ, Christe ME, Collins KA, Pirro V, Droz BA, Holland AK, et al. GIPR agonism mediates weight-independent insulin sensitization by tirzepatide in obese mice. *J Clin Invest*. 2021;131(12):e146353.

Thomas MK, Nikooienejad A, Bray R, Cui X, Wilson J, Duffin K, et al. Dual GIP and GLP-1 receptor agonist tirzepatide improves beta-cell function and insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;Jan,23;106(2):388-396.

Urva S, Coskun T, Loghin C, Cui X, Beebe E, O'Farrell L, et al. The novel dual glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist tirzepatide transiently delays gastric emptying similarly to selective long-acting GLP-1 receptor agonists. *Diabetes Obes Metab*. 2020;Oct,22(10):1886-1891.

Willard FS, Douros JD, Gabe MBN, Showalter AD, Wainscott DB, Suter TM, et al. Tirzepatide is an imbalanced and biased dual GIP and GLP-1 receptor agonist. *JCI Insight*. 2020;5(17):e140532.

Yoneshiro T, Wang Q, Tajima K, Matsushita M, Maki H, Igarashi K, et al. BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature*. 2019;Aug,572(7771):614-619.

マンジャロ皮下注 2.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 5mg アテオス
マンジャロ皮下注 7.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 10mg アテオス
マンジャロ皮下注 12.5mg アテオス
マンジャロ皮下注 15mg アテオス

2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary 1
2.6.3.1 Pharmacology: Overview 1
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics 4
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics 6
2.6.3.4 Safety Pharmacology 7
2.6.3.5 Pharmacodynamic Drug Interactions 8

2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2.6.3.1. Pharmacology: Overview

Table 2.6.3.1–1. Overview of Pharmacology Studies

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Section #
Primary Pharmacodynamics					
Receptor binding affinity	HEK-293 cells Cloned mouse, rat, monkey and human GIP or GLP-1 receptors	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	DBT201	4.2.1.1.1
Receptor radioligand binding and induced intracellular cAMP accumulation	HEK-293 cells Expressing GIP or GLP-1 receptors	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO123	4.2.1.1.2
Intracellular cAMP measurement	HEK-293 cells Expressing GIP, GLP-1, GLP-2, or GCG (Gluc) receptors	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	QSB24	4.2.1.1.3
Functional GTP recruitment	HEK-293 cells Expressing GIP or GLP-1 receptors	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO124	4.2.1.1.4
β-arrestin-2 recruitment	CHO-K1 cells	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	QSB171	4.2.1.1.5
Receptor internalization	HEK-293 cells Expressing GIP or GLP-1 receptors	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO125	4.2.1.1.6
Insulin secretion	Rat and mouse pancreatic islets	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	DBT203	4.2.1.1.7
Human adipocyte cAMP and lipolysis assay	Adipocytes Expressing GIP receptors	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO130	4.2.1.1.8
Intraperitoneal glucose tolerance test	C57/Bl6 mice	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO126	4.2.1.1.9
Insulin secretion-intravenous glucose tolerance test	Wistar rats	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	DBT205	4.2.1.1.10
Insulin sensitization-hyperinsulinemic euglycemic clamp study	Long-Evans rats	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO127	4.2.1.1.11

(continued)

Table 2.6.3.1–1. Overview of Pharmacology Studies

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Section #
Insulin sensitization-hyperinsulinemic euglycemic clamp study	C57/Bl6 mice	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO128	4.2.1.1.12
Plasma and BAT levels of BCAAs after chronic treatment	C57/Bl6 mice	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	ENDO129	4.2.1.1.13
Acute treatment effect on gastric emptying	C57/Bl6 mice	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	DBT207	4.2.1.1.14
Acute and chronic effect on gastric emptying	C57/Bl6 mice	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	Urva et al.2020	4.2.1.1.16
Body weight management	C57/Bl6 mice	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	DBT206	4.2.1.1.15
Body weight management	C57/Bl6 mice	SC	Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana, USA	Coskun et al. 2018	4.2.1.1.17
Secondary Pharmacodynamics					
Not applicable					
Safety Pharmacology					
hERG Ion Channel[a]	HEK-293 cells transfected with hERG clone	In vitro	[redacted] USA	180917.FMD	4.2.1.3.1
Cardiovascular[a]	Monkey, Cynomolgus	SC	[redacted] USA	8323700	4.2.1.3.2
Cardiovascular[a,b]	Monkey, Cynomolgus	SC	[redacted] USA	8325823	4.2.3.2.4
Cardiovascular[a,c]	Monkey, Cynomolgus	SC	[redacted] USA	8336517	4.2.3.2.5
Central Nervous System[a, b]	Monkey, Cynomolgus	SC	[redacted] USA	8325823	4.2.3.2.4
Respiratory System[a, b]	Monkey, Cynomolgus	SC	[redacted] USA	8325823	4.2.3.2.4
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Not applicable					

(continued)

Table 2.6.3.1–1. Overview of Pharmacology Studies (Concluded)

Abbreviations: BAT = brown adipose tissue; BCAA = branched-chain amino acid; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; CHO = Chinese hamster ovary; DIO = diet-induced obesity; GCG or Gluc = glucagon; GIP = glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GLP-1 = glucagon-like peptide-1; GLP-2 = glucagon-like peptide-2; GTP = guanosine triphosphate; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether–à-go-go-related gene; SC = subcutaneous.

[a] Contains a GLP compliance statement.

[b] A repeat-dose toxicity and toxicokinetic study dosed once weekly for 1 month.

[c] A repeat-dose toxicity and toxicokinetic study dosed once weekly for 6 months with a 4 month recovery period.

2.6.3.2. Primary Pharmacodynamics

Table 2.6.3.2–1. Overview of Primary Pharmacology Studies: in vivo

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses	Number of Replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Intraperitoneal glucose tolerance test	C57/Bl6 mice	SC	0.01, 0.1, 1, 10, and 100 nmol/kg	1	In an intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT), tirzepatide improved glucose tolerance in normal or transgenic mice lacking either GIPR or GLP-1R, demonstrating that tirzepatide acted through both receptors.	No	ENDO126
Insulin secretion-intravenous glucose tolerance test	Wistar rats	SC	0.1, 0.3, 1, 3, and 10 nmol/kg	1	In an intravenous glucose tolerance test (ivGTT) in rats, tirzepatide enhanced insulin secretion by up to 198% of vehicle control 16 hours post dose, with a half-maximally efficacious dose (ED_{50}) of 0.87 nmol/kg tirzepatide	No	DBT205
Insulin sensitization-hyperinsulinemic euglycemic clamp study	Long-Evans rats	SC	10 nmol/kg	1	Chronic dosing of tirzepatide to the insulin-resistant rats improved whole body insulin sensitization as demonstrated under hyperinsulinemic euglycemic clamp condition.	No	ENDO127
Insulin sensitization-hyperinsulinemic euglycemic clamp study	C57/Bl6 mice	SC	3 nmol/kg and 10 nmol/kg	1	In the clamp models using obese insulin-resistant mice, tirzepatide improved insulin sensitivity.	No	ENDO128
Plasma and BAT levels of BCAAs after chronic treatment	C57/Bl6 mice	SC	3 nmol/kg and 10 nmol/kg	1	Mechanistic studies indicated that the systemic insulin sensitization effect of tirzepatide was mediated, at least in part, by activation of metabolic pathways associated with the catabolism of BCAAs in brown adipose tissue	No	ENDO129

(continued)

Table 2.6.3.2–1. Overview of Primary Pharmacology Studies: in vivo (Concluded)

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses	Number of Replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Acute treatment effect	C57/Bl6 mice	SC	3, 10, 30, and 100 nmol/kg	1	Single administration of tirzepatide inhibited gastric emptying of a semi-liquid meal given by gavage to mice with maximal inhibition observed at 10 nmol/kg	No	DBT207
Body weight management	C57/Bl6 mice	SC	10 to 100 nmol/kg	1	In diet-induced obese (DIO) mice, tirzepatide induced significant dose-responsive body weight loss, which was predominantly loss of fat mass. The ED_{50} was 5 nmol/kg. These studies suggested two mechanisms underlie weight loss following tirzepatide treatment: an initial phase characterized by strong suppression of food intake, followed by a second phase where we observe an increased level of energy utilization. Also, A 2-week treatment of DIO mice with tirzepatide resulted in significant dose-responsive reductions in plasma total cholesterol (>50%) and liver fat content (>65%).	No	DBT206

Abbreviations: BAT = brown adipose tissue; BCAA = branched-chain amino acid; DIO = diet-induced obese; ED_{50} = half-maximally efficacious dose; GIPR = glucose-dependent insulinotropic peptide receptor; GLP-1R = glucagon-like peptide-1 receptor; ivGTT = intravenous glucose tolerance test; ipGTT = intraperitoneal glucose tolerance test; ED_{50} = half-maximally efficacious dose; SC = subcutaneous.

2.6.3.3. Secondary Pharmacodynamics

Not applicable.

2.6.3.4. Safety Pharmacology

Table 2.6.3.4–1. Safety Pharmacology Studies

Organ Systems Evaluated	Species, Strain	Route	Test article(s) Doses[a]	Sex #/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID
Cardiovascular Ion Channel Effects (in vitro)	HEK-293 cells transfected with hERG clone	In vitro	0 μM[b] 30 μM 300 μM	3 cells/group	IC_{50} > 300 μM	Yes	180917.FMD
Cardiovascular Effects (in vivo)[c]	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous injection	0 mg/kg[d] 0.05 mg/kg 0.15 mg/kg	Male/6	≥0.05 mg/kg: ↑heart rate; ↓dP/dt_{max} 0.15 mg/kg: ↑diastolic blood pressure; ↑mean arterial pressure; ↓ pulse pressure NOEL < 0.05 mg/kg	Yes	8323700
Cardiovascular Effects (in vivo)[e,f]	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous injection	0 mg/kg[d] 0.05 mg/kg 0.15 mg/kg 0.5 mg/kg	Male/3; Female/3	≥0.15 mg/kg: ↑heart rate in males only NOEL = 0.05 mg/kg	Yes	8325823
Cardiovascular Effects (in vivo)[g,h]	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous injection	0 mg/kg[d] 0.05 mg/kg 0.15 mg/kg 0.5 mg/kg	Male/7; Female/7 Male/4; Female/4 Male/4; Female/4 Male/7; Female/7	≥0.15 mg/kg: ↑heart rate NOEL = 0.05 mg/kg	Yes	8336517
Central Nervous System Effects (in vivo)[e]	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous injection	0 mg/kg[d] 0.05 mg/kg 0.15 mg/kg 0.5 mg/kg	Male/3; Female/3	No neurological or body temperature observations were noted. NOEL = 0.5 mg/kg	Yes	8325823
Respiratory System Effects (in vivo)[e]	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous injection	0 mg/kg[d] 0.05 mg/kg 0.15 mg/kg 0.5 mg/kg	Male/3; Female/3	No respiratory observations were noted. NOEL = 0.5 mg/kg	Yes	8325823

(continued)

Table 2.6.3.4–1.　Safety Pharmacology Studies (Concluded)

Abbreviations: # = number; ↑ = increased; ↓ = decreased; dP/dt_{max} = a surrogate measure for contractility; ECG = electrocardiogram; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; NOEL = no-observed-effect level.

[a] Single dose unless specified otherwise.

[b] HEPES-buffered physiological saline (HB-PS) solution (composition in mM): NaCl, 137; KCl, 4.0; $CaCl_2$, 1.8; $MgCl_2$, 1; HEPES, 10; Glucose, 10; pH adjusted to 7.4.

[c] Single dose in a parallel design cardiovascular safety pharmacology study.

[d] 10 mM tris, 150 mM NaCl, and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2.

[e] A repeat-dose toxicity and toxicokinetic study dosed once weekly for 1 month.

[f] ECGs collected on days 8 and 22.

[g] A repeat-dose toxicity and toxicokinetic study dosed once weekly for 6 months with a 4 month recovery period.

[h] ECGs collected on days 8, 78, and 169.

2.6.3.5.　Pharmacodynamic Drug Interactions

Not applicable.