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

2.6.6　毒性試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.6　毒性試験の概要文 1
2.6.6.1　まとめ 1
2.6.6.2　単回投与毒性試験 3
2.6.6.3　反復投与毒性試験 4
2.6.6.3.1　マウス 4
2.6.6.3.1.1　マウス 4 週間反復投与毒性試験 4
2.6.6.3.2　ラット 6
2.6.6.3.2.1　ラット 1 ヵ月間反復投与毒性試験 6
2.6.6.3.2.2　ラット 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 4 ヵ月間回復試験 7
2.6.6.3.3　サル 10
2.6.6.3.3.1　サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験 10
2.6.6.3.3.2　サルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 4 ヵ月間回復試験 11
2.6.6.4　遺伝毒性試験 13
2.6.6.4.1　ラット骨髄小核試験 13
2.6.6.5　がん原性試験 13
2.6.6.5.1　RasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験 13
2.6.6.5.2　ラットを用いた 2 年間がん原性試験 15
2.6.6.6　生殖発生毒性試験 17
2.6.6.6.1　ラットを用いた雄の受胎能に関する試験 17
2.6.6.6.2　ラットを用いた雌の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 18
2.6.6.6.3　ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験 19
2.6.6.6.4　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 21
2.6.6.6.5　ラットを用いた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 23
2.6.6.6.6　幼若ラットを用いた毒性試験 25
2.6.6.7　局所刺激性試験 26
2.6.6.8　その他の毒性試験 26
2.6.6.8.1　光毒性試験 26
2.6.6.8.2　不純物の安全性確認試験 27
2.6.6.8.2.1　不純物の安全性確認試験（8394210 試験） 27
2.6.6.8.2.2　不純物の安全性確認試験（8420235 試験） 28
2.6.6.8.3　不純物の評価 28
2.6.6.8.3.1　非遺伝毒性不純物 28
2.6.6.8.3.2　遺伝毒性不純物 31
2.6.6.9　考察及び結論 31
2.6.6.10　図表 32
2.6.6.11　参考文献 32

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

Tirzepatide（別称：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）。

Tirzepatide の包括的な一連の毒性試験を、カニクイザル及び Sprague Dawley ラットを用いて実施した（表 2.6.6-1）。Tirzepatide の毒性試験は、長期使用の適応症を対象とした長時間作用型ペプチドであることを考慮して計画した。これらの試験は米国食品医薬品局（United States Food and Drug Administration：FDA）、欧州医薬品庁（European Medicines Agency：EMA）、厚生労働省（Ministry of Health, Labour and Welfare：MHLW）及び医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation：ICH）の適用可能なガイダンス文書に一致するものであった。主要な毒性試験、トキシコキネティクス試験及び安全性薬理試験は「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。毒性試験において GLP 非適用下で実施した一部の手順（被験物質特性の検討等）については試験報告書内に記載したが、いずれも試験の結果の解釈及び試験の信頼性に影響を及ぼすものではなかった。動物種選択の妥当性、用量設定及び投与間隔等の非臨床毒性試験計画に関する詳細を CTD 第 2.4.1 項に示し、以下に要約する。

- Tirzepatide の毒性試験には主にカニクイザル、Sprague Dawley ラットを用いた。いずれの動物種もヒトでの薬理活性に類似した薬理活性を示すことが確認されている（CTD 第 2.4.1.1.1 項）。ウサギ及びマウスにおいても類似した薬理活性が示されたことから、ウサギは胚・胎児発生の評価のための 2 番目の動物種として、マウスはがん原性の評価のための 2 番目の動物種として、それぞれ適切であることが示された。001178-T（ヘミ接合）RasH2 マウスを用いたがん原性試験の用量設定試験には 001178-W（野生型）RasH2 マウスを用いたが、同マウスは用量設定試験で用いる適切なサロゲート種とされている（ICH S1B; Storer et al. 2010）。
- サル及びラットを用いた反復投与毒性試験の投与期間は 1 及び 6 ヵ月であった。安全性薬理の評価項目は、サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験及びサルを用いた反復投与毒性試験において評価した。また、tirzepatide についてヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（human ether-a-go-go-related gene：hERG）試験を実施した。In vivo 遺伝毒性試験（小核試験）及びがん原性試験を、げっ歯類を用いて実施した。受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験並びに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を、ラットを用いて実施した。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験も実施した。また、小児を対象とした開発をサポートするため、成長及び発達への影響の有無を評価する目的で、幼若ラットを用いた毒性試験を実施した。
- いずれの毒性試験においても、tirzepatide は臨床での投与経路と同じ皮下投与により投与した。

- 反復投与毒性試験において、tirzepatide をサルには週 1 回、ラットには週 2 回の頻度で投与した。臨床試験における投与頻度は週 1 回であるが、ラットを用いた毒性試験では、全身曝露量を最大にして潜在的な毒性の検出能を上げるため、週 2 回投与した。
- Tirzepatide の薬理作用に起因する顕著な体重及び摂餌量低下に基づく最大耐量（maximally tolerated dose：MTD）及び動物福祉上の懸念を考慮し、高用量を設定した。

表 2.6.6-1. Tirzepatide の毒性試験一覧

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	試験番号
反復投与毒性試験			
4 週間反復投与毒性試験	皮下	マウス、RasH2	8376621
1 ヵ月間反復投与毒性試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	8325822
6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 4 ヵ月間回復性試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	8337876
1 ヵ月間反復投与毒性試験	皮下	カニクイザル	8325823
6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 4 ヵ月間回復性試験	皮下	カニクイザル	8336517
遺伝毒性試験			
In vivo 小核試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	8395235
がん原性試験			
26 週間がん原性試験	皮下	マウス、RasH2	8392063
2 年間がん原性試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	8392734
生殖発生毒性試験			
雄の受胎能に関する試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	00353430
受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	WIL-353356
胚・胎児発生に関する予備試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	WIL-353352
胚・胎児発生に関する試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	WIL-353354
胚・胎児発生に関する予備試験	皮下	ウサギ、NZW	WIL-353353
胚・胎児発生に関する試験	皮下	ウサギ、NZW	WIL-353355
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	皮下	ラット、Sprague Dawley	00353460
幼若動物を用いた毒性予備試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	00353459
幼若動物を用いた毒性試験	皮下	ラット、Sprague Dawley	00353469
その他の毒性試験			
不純物の安全性確認	皮下	ラット、Sprague Dawley	8394210
不純物の安全性確認	皮下	ラット、Sprague Dawley	8420235

毒性試験で見られた主要所見を以下に要約する。

- 毒性試験で見られた tirzepatide の主な影響は、インクレチンの薬理作用に一致するか又はそれによる二次的なものであった。反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験で見られた重要な tirzepatide に関連した所見として、体重増加量低下及び／又は体重低下並びに摂餌量低下が認められた。
- サル 1 ヵ月間反復投与毒性試験で実施した安全性薬理評価において、中枢神経系及び呼吸系に対する安全性上の懸念は認められなかった。
- サル 1 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験で実施した安全性薬理評価において、心拍数増加が見られた。単回投与心血管系安全性薬理試験では心拍数増加に加えて、血圧上昇及び心収縮性低下も認められた（CTD 第 2.6.2.4.1.1 項）。これらの心血管系への影響は、GLP-1 受容体アゴニストの薬理作用に一致していた。いずれの試験においても、補正 QT（corrected QT：QTc）間隔の変化は見られなかった。

- いずれの毒性試験においても、tirzepatide に直接関連する死亡は認められなかった。ウサギの胚・胎児発生に関する試験ではすべての用量で死亡が見られたが、体重／摂餌量に対する tirzepatide の薬理作用に関連する二次的変化並びに消化管運動性の変化に対するウサギ特有の感受性に起因する胃腸病変から流産及び死亡に至ったと考えられた。
- Tirzepatide を週 2 回（ラット）又は週 1 回（サル）の頻度で最長 6 ヵ月間皮下投与（最高用量はラット及びサルでそれぞれ 3 及び 0.5 mg/kg）したラット及びサルのいずれにおいても、直接的な標的器官毒性は認められなかった。
- Tirzepatide はラットを用いた in vivo 遺伝毒性試験（小核試験）において陰性であった。
- Tirzepatide の週 2 回皮下投与を約 2 年間受けた雌雄のラットにおいて、すべての tirzepatide 投与群（0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg）で甲状腺の C 細胞過形成及び腫瘍（C 細胞腺腫及び／又は癌）の発現頻度が増加した。甲状腺 C 細胞で認められた過形成性及び腫瘍性の変化は、長時間作用型 GLP-1 受容体アゴニストに関して甲状腺で報告されている所見に一致していた。Tirzepatide の 1.5 mg/kg までの用量での投与を受けたラットでは、いずれの用量においてもその他の腫瘍性所見は認められなかった。
- Tirzepatide の 10 mg/kg までの用量での週 2 回、26 週間の皮下投与を受けた 001178-T（ヘミ接合）RasH2 マウスにおいて、腫瘍性の所見は認められなかった。
- ラットを用いた雌の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験において、黄体数減少の結果として着床数及び生存胚数が減少し、性周期も障害された。これらの変化は、すべての用量で認められた体重減少及び摂餌量減少による二次的変化と考えられた。交尾率及び受胎率、交尾所要日数並びに着床前及び着床後胚損失率には変化は認められなかった。
- 雄の受胎能に関する試験において、精子、生殖能、雄性生殖器官及び初期胚生存に変化は認められなかった。
- 発生への影響（ラット及びウサギでの胎児体重減少並びにラットでの奇形及び変異の増加）は、母動物毒性（体重低下）が見られた用量でのみ発現した。
- 幼若ラットで見られた影響は体重及び摂餌量に対する薬理作用並びにそれによる二次的変化のみであり、成獣ラットで見られた所見と一致したことから幼若動物に特有の tirzepatide の毒性はないことが示された。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

規制ガイダンス［ICH M3 (R2); ICH S6 (R1) ］に従い、tirzepatide について独立した単回投与毒性試験は実施しなかったが、tirzepatide 単回投与による影響は、サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験（CTD 第 2.6.2.4 項）並びにマウス、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験（CTD 第 2.6.6.3 項）の初回投与後の所見に基づき評価した。いずれの試験においても、tirzepatide に関連した変化はインクレチンの薬理作用に一致していた。

単回投与心血管系安全性薬理試験において、すべてのサルが tirzepatide の 0.05 又は 0.15 mg/kg の用量での皮下投与後に生存した。0.15 mg/kg 群で摂餌量の低下が低頻度で見られ、軽度の体重低下（投与前の最終測定から投与期間の 5 日目にかけて群平均で 0.2 kg 低下）が認められた。0.05 mg/kg 群では摂餌量及び体重の変化は見られなかった。

マウス、ラット及びサルを用いた反復皮下投与毒性試験の結果に基づくと、tirzepatide の最高用量（それぞれ 30、3 及び 0.5 mg/kg）での初回投与後の忍容性は、いずれの動物種においても良好であったことから、概略の致死量はマウス、ラット及びサルでそれぞれ 30、3 及び 0.5 mg/kg を超える用量であった。すべての反復投与毒性試験における単回投与後の tirzepatide に関連した変化は、体重及び摂餌量の低下であった。いずれの試験及び動物種においても、tirzepatide に直接関連した死亡及び tirzepatide に直接関連する全身毒性は認められなかった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

Tirzepatide は、GLP-1 受容体及び GIP 受容体に対して特異的なアゴニスト活性を示す選択的長時間作用型合成ペプチドである。Tirzepatide のオフターゲット作用は示唆されていない。1 ヵ月間反復投与毒性試験で見られた所見は、インクレチンの薬理作用又はそれによる二次的変化に一致しており、体重及び／又は摂餌量並びに心血管系に対する薬理作用に限定されていた。1 ヵ月間反復投与毒性試験において tirzepatide の最高用量を投与されたラット及びサルのいずれにおいても、直接的な標的器官毒性は示唆されず、種特異的な所見は見られなかった。以上のことから、サルを用いた反復投与毒性試験の最長投与期間として 6 ヵ月を選択した。6 ヵ月は ICH S6 の原則に一致しており、より長期の毒性試験を行っても更なる毒性は特定されないと予想されることを支持する報告（Olson et al. 2000; Heidel and Page 2010; Tamaki et al. 2013）にも一致している。

1 及び 6 ヵ月間の反復投与毒性試験を、若い成獣のカニクイザル及び Sprague Dawley ラットを用いて実施した。すべての試験で tirzepatide のトキシコキネティクス評価を実施した（CTD 第 2.6.4 項）。サルの 1 及び 6 ヵ月間反復投与毒性試験では安全性薬理評価を実施した（CTD 第 2.6.2.4 項）。いずれの動物種においても、毒性が認められた場合の回復性を評価するため、6 ヵ月間反復投与毒性試験に休薬期間をおいた。また、マウス 26 週間がん原性試験の用量を決定するため、マウス 4 週間反復投与毒性試験を実施した。

すべての試験において、tirzepatide は臨床投与経路と同じく皮下投与とした。溶媒には 10 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム、0.02%ポリソルベート 80（pH 7.0 ± 0.2）を用いた。Tirzepatide 投与液の濃度は、用量及び提供された被験物質の濃度に応じて 0.1～5 mg/mL の範囲とした。マウス及びラットを用いた反復投与毒性試験では、ヒトにおける週 1 回投与時の曝露を十分にサポートする曝露量を得るため週 2 回の頻度で投与した。

2.6.6.3.1　マウス

2.6.6.3.1.1　マウス 4 週間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.1、8376621 試験、概要表 2.6.7.7-1）

本試験（8376621 試験、概要表 2.6.7.7-1）の目的は、tirzepatide を 001178-W（野生型）RasH2 マウスに 4 週間（合計 8 回）投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価するとともに、001178-T（ヘミ接合）RasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験の用量を決定することであった。

Tirzepatide を雌雄の RasH2 マウスに 0、1、3 及び 30 mg/kg の用量（10 mL/kg の投与容量）で週 2 回、4 週間（1、5、8、12、15、19、22 及び 26 日目）皮下投与した。毒性試験群は 1 群雌雄各 10 例とした。トキシコキネティクス評価のため、サテライト群として、tirzepatide 群には雌雄各

45 例、対照群には雌雄各 9 例を割り付けた。予想される体重変化の程度を考慮し、投与 1 日目以降、すべてのマウスに栄養補給食（DietGel）を補充した。

本試験の用量は、CD-1 マウスを用いて 0、3、10 及び 30 mg/kg の用量で週 2 回皮下投与した 2 週間予備試験（8367322 試験）の結果に基づいて設定した。2 週間予備試験ではすべてのマウスが終了時まで生存し、tirzepatide に関連した一般状態の変化は認められなかった。統計学的に有意な体重減少及び摂餌量低下が、すべての tirzepatide 投与群で 5 日目まで認められた。10 mg/kg 以上の群のマウスには 5 日目に DietGel を補給し、3 mg/kg 群のマウスには 9 日目以降に DietGel を補給した。DietGel の補給後に体重は増加し始めたが、10 mg/kg 以上の群の全例及び 3 mg/kg 群の雄の投与期間終了時の体重には対照群と比較し有意な減少が認められた。すべての用量で認められた体重低下は tirzepatide に関連した変化と考えられたが、DietGel の補充により体重変化は緩和しマウスの全般的健康への影響は認められなかった。摂餌量及び体重の変化は薬理作用から予想される変化であり、他の GLP-1 受容体アゴニストを投与されたマウスで見られる変化とも一致していた。以上の 2 週間予備試験成績より、4 週間反復投与毒性試験の高用量は 30 mg/kg に設定した。この用量では、体重低下が生じるものの全般的健康への影響はないと予想された。体重増加への軽微な影響が予測される 1mg/kg を低用量に、3 mg/kg を中用量に設定した。

Tirzepatide に関連した死亡は認められなかった。生存期間中における tirzepatide に関連した変化として、統計学的に有意な体重減少がすべての用量で、一般状態の変化の削痩が 1 及び 30 mg/kg 群で認められた。これらの所見は投与初日からの DietGel の補充にかかわらず認められた。

臨床検査で見られた tirzepatide に関連した変化は概して軽度であり、その内訳は、赤血球量の軽微な減少（軽微な赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリットの減少）及び赤血球ヘモグロビンの軽微な減少（1 mg/kg 以上の群の雌）、グルコース濃度の中等度の低下及び血清尿素窒素濃度の軽微な上昇（1 mg/kg 以上の群の雄）並びにアルブミン濃度の軽微な上昇（3 mg/kg 以上の群の雄）であった。これらの変化の発症機序は特定されなかったが、体重低下が関連している可能性が高いと考えられた。

投与終了時の剖検において、tirzepatide に関連した病理組織学的所見が、1 mg/kg 以上の群の雌で生殖器官、副腎（皮質）及び顎下腺に、1 mg/kg 以上の群の雄で肝臓に、3 mg/kg 以上の群の雄で膵臓に、それぞれ認められた。1 mg/kg 以上の用量での雌性生殖器官の所見として、卵巣における黄体数の中等度から重度の減少、子宮及び子宮頸部の軽度の萎縮並びに膣の軽度から中等度の上皮萎縮（しばしば粘液産生を伴う）が認められた。副腎皮質の所見として、対照群と比較して頻度／重症度が増加した X 帯の退縮及び空胞変性の減少が認められ、これらは性ホルモン変化の結果の可能性が考えられた。顎下腺で見られた唯一の所見は、顆粒管における軽微から軽度の分泌枯渇であった。肝臓の所見として、肝細胞グリコーゲンの軽微から軽度な減少の発現頻度及び／又は重症度増加が認められ、それに関連した肝重量の減少が認められた。膵臓で見られた唯一の所見は、腺房細胞におけるチモーゲン顆粒の軽微な減少であった。これらの病理組織学的所見は、体重低下及び／又は tirzepatide の薬理作用に関連した代謝変化による二次的変化と考えられたため、毒性変化ではないと判断した。Tirzepatide に関連した肉眼所見は認められなかった。

以上、tirzepatide を 30 mg/kg までの用量で RasH2 マウスに週 2 回、4 週間皮下投与したところ、忍容性が認められた。すべての用量における tirzepatide に関連した所見として、DietGel による緩

和にもかかわらず体重減少が雌雄で認められ、生殖器官及び副腎皮質の病理組織学的所見が雌で認められた。体重に対する影響は過剰な薬理作用と考えられ、GLP-1 受容体アゴニストを含むインクレチン薬で予想される作用であった（Rossi and Nicolucci 2009）。雌性生殖器官及び副腎皮質における病理組織学的所見は一般的に性周期欠如に伴って認められる変化であり、体重低下による二次的変化と考えられた。本試験における無毒性量（no observed adverse effect level：NOAEL）は 30 mg/kg であり、同用量での投与 26 日目における C_{max} は雄及び雌でそれぞれ 217 及び 252 μg/mL、$AUC_{0\text{-}96hr}$ は雄及び雌でそれぞれ 4860 及び 5470 μg•hr/mL であった。

2.6.6.3.2　ラット

2.6.6.3.2.1　ラット 1 ヵ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.2、8325822 試験、概要表 2.6.7.7-2）

本試験（8325822 試験、概要表 2.6.7.7-2）の目的は、tirzepatide を Sprague Dawley ラットに 1 ヵ月間（合計 9 回）投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価することであった。

Tirzepatide を 0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg の用量（0.5 mL/kg の投与容量）で雌雄のラットに週 2 回 1 ヵ月間皮下投与した。毒性試験群は 1 群雌雄各 10 例とした。トキシコキネティクス評価のため、サテライト群として、tirzepatide 群には雌雄各 14 例、対照群には雌雄各 5 例を割り付けた。

本試験の用量は、ラットに 0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg の用量で週 2 回皮下投与した 2 週間予備試験（8306796 試験）の結果に基づいて設定した。体重及び摂餌量に用量依存的な低下がすべての用量で認められ、0.5 及び 1.5 mg/kg 群での変化は重要と考えられた。最大の低下は 3 日目に認められた（対照群と比較して、高用量群の雄で 19%低下、雌で 10%低下）。15 日目における中及び高用量群の雄の体重は、対照群と比較してそれぞれ 8%及び 14%低下した。15 日目の雌の体重は、いずれの群においても対照群と同程度であった。注射部位、器官重量及び臨床検査には、tirzepatide に関連した重要な変化は認められなかった。以上の 2 週間予備試験の結果より、1 ヵ月間反復投与毒性試験で 1.5 mg/kg を高用量として投与した場合、主に第 1 週に体重低下が起こると予想された。低用量の 0.15 mg/kg では体重及び摂餌量の軽度な変化が起こると予想され、ほぼ対数中点である中用量では、体重増加量低下及び摂餌量低下が用量関連性に認められると予想された。

死亡は発現せず、tirzepatide に関連した一般状態の変化及び眼科学的所見は認められなかった。注射部位の所見は認められなかった。

統計学的に有意な体重低下及び摂餌量低下が投与期間の第 1 週に認められ、体重については投与期間終了時まで持続的に認められた。投与期間終了時の 0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の体重は、対照群と比較して、雄ではそれぞれ 7.2%、14.8%及び 11.6%、雌ではそれぞれ 5.9%、8%及び 11.4%低下した。

Tirzepatide に関連した血液学的所見は、すべての用量で雌に認められた赤血球量の軽微な減少（赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット）のみであった。赤血球量の変化の程度はすべての用量で同程度であり、明確な用量依存性は認められなかった。摂餌量減少及び体重増加量低下（tirzepatide の予想される作用）に関連する赤血球産生減少が、赤血球量減少の原因となった可能性があると考えられた。すべての用量で雌に認められた絶対網状赤血球数の軽微な減少はこのメカニズムを支持するものではあったが、一貫した変化ではなかったことから、明確な

tirzepatide との関連性は認められなかった。Tirzepatide に関連した血液生化学的所見として、血清総タンパク及びアルブミン濃度の軽微から軽度な低下が、すべての投与群の雄及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌で、グロブリン濃度の軽微な低下が 0.5 mg/kg 以上の群の雄で、血清アルカリホスファターゼ（ALP）活性の軽微から軽度な増加がすべての投与群の雄及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌で、血清カルシウム濃度の軽度な低下が 0.5 mg/kg 以上の群の雌雄で、それぞれ認められた。循環血中カルシウムの約半量はアルブミンに結合していることから、カルシウム濃度低下はアルブミン濃度低下による二次的変化と考えられた。血清タンパクの変化は、tirzepatide の予想される作用である摂餌量低下及び体重増加量低下に関連している可能性が考えられた。Tirzepatide に関連した尿検査所見は、1.5 mg/kg 群の雄における尿量の軽度な増加及び尿比重の軽度な低下のみであった。これらに関連した腎障害／機能異常を示す臨床検査所見及び病理学的所見は認められなかったことから、尿検査における軽度な変化は毒性学的に重要でないと考えられた。臨床検査において、tirzepatide に関連した変化の一部はすべての用量で発現したが、いずれも関連する病理組織学所見が認められず、軽微から軽度な変化であったことから、毒性学的に重要ではないと判断した。臨床検査における変化の多くは、tirzepatide で予想される変化である摂餌量低下及び体重増加量低下に関連していた。

Tirzepatide に関連した肉眼所見及び病理組織学的所見は認められなかった。Tirzepatide に関連した器官重量の変化は、いずれも体重低下による二次的変化であり、その内訳は、心臓、肝臓及び脾臓の絶対重量及び脳比重量の減少並びに脳、精巣上体、腎臓及び子宮の体重比重量の増加であった。

以上、tirzepatide を 0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg の用量でラットに週 2 回、1 ヵ月間皮下投与したところ、忍容性が認められた。体重及び摂餌量の用量依存的な低下がすべての tirzepatide 投与群で認められたが、毒性変化ではないと判断した。標的器官毒性は認められなかった。摂餌量及び体重への影響は過剰な薬理作用であり、GLP-1 受容体アゴニストを含むインクレチン薬で予想されるものである（Rossi and Nicolucci 2009）。本試験における NOAEL は 1.5 mg/kg であり、同用量での投与 29 日目における C_{max} は雄及び雌でそれぞれ 4.29 及び 5.22 μg/mL、$AUC_{0\text{-}96hr}$ は雄及び雌でそれぞれ 124 及び 143 μg•hr/mL であった。

2.6.6.3.2.2　ラット 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 4 ヵ月間回復試験

（添付資料 4.2.3.2.3、8337876 試験、概要表 2.6.7.7-3）

本試験（8337876 試験、概要表 2.6.7.7-3）の目的は、tirzepatide を Sprague Dawley ラットに 6 ヵ月間投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価するとともに、変化が認められた場合の 4 ヵ月間の休薬期間後の回復性を評価することであった。

Tirzepatide を雌雄のラットに 0、0.5、1.5 及び 3 mg/kg の用量（1 mL/kg の投与容量）で週 2 回皮下投与した。投与終了時屠殺群は 1 群雌雄各 15 例とし、対照群及び 3 mg/kg 群の雌雄各 5 例について投与終了後の休薬期間を設けた。トキシコキネティクス評価のため、サテライト群として、tirzepatide 群には雌雄各 18 例、対照群には雌雄各 6 例を割り付けた。

高用量の 3 mg/kg は、1.5 mg/kg までの用量で良好な忍容性が認められた 1 ヵ月間反復投与毒性試験（8325822 試験）の結果に基づいて設定した。即ち、1 ヵ月試験において、対照群と比較し

た 1.5 mg/kg 群の体重低下は 20%未満であったことから、本試験の高用量は、MTD を超えることなくより著しい体重変化を得るため、倍の 3 mg/kg に設定した。

Tirzepatide に関連した死亡及び眼科学的所見は認められなかった。Tirzepatide に関連した一般状態の変化は、3 mg/kg 群の雄 2 例及び雌 7 例で 180 日目のみに認められた円背位のみであった。この所見は休薬期間には発現しなかった。

対照群と比較して、予想される薬理作用に一致する tirzepatide に関連した統計学的に有意かつ用量依存的な体重低下が、0.5 mg/kg以上の群で認められた。投与期間終了時に、対照群の体重と比較して、0.5、1.5 及び 3 mg/kg 群の体重が、雄でそれぞれ 20.6%、23.7%及び 29.5%、雌でそれぞれ 20.4%、23.8%及び 23.8%低下した。休薬期間中の体重増加量は、対照群の雄で 82 g、雌で 66 g であったのに対し、tirzepatide 3 mg/kg 群の雄では 194 g、雌では 104 g であった。休薬期間終了時の 3 mg/kg 群における体重は、対照群の体重と比較して、雄で 4%、雌で 16%低下していた。

統計学的に有意で用量依存的な摂餌量低下が、0.5 mg/kg以上の群で投与期間の大半を通して認められ、1.5 mg/kg 以上の群の雄及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌では投与期間全体を通して認められた。3 mg/kg 群の摂餌量は、休薬期間の初期にはやや増加したが、残りの休薬期間中は対照群とほぼ同程度であった。

投与終了時屠殺時（投与 180 日目）に見られた tirzepatide に関連した血液学的検査所見は、0.5 mg/kg以上の群での絶対網状赤血球数の軽度な減少のみであり、この変化は、摂餌量低下、体重の低下及びその二次的変化である脾重量の減少並びに脾髄外造血減少に関連して発現した可能性がある。これらの血液学的変化は、休薬期間終了時には認められなかった。

血液生化学的検査における tirzepatide に関連した変化は全般的に軽度であり、休薬期間終了時には認められなかった。投与終了時屠殺時（投与 180 日目）に見られた特筆すべき tirzepatide に関連した変化は、1.5 mg/kg 以上の群の雄及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌で見られたアミラーゼ活性の軽度な減少であった。他に、血清総タンパク濃度の軽度な低下（アルブミン及び／又はグロブリン濃度の軽微から軽度な低下に起因する）及び総コレステロール値及びトリグリセリド濃度の軽微から軽度の低下が 0.5 mg/kg 以上の群で認められたが、これらは体重低下及び／又は摂餌量低下に関連して発現した可能性がある。0.5 mg/kg以上の群の雌で見られたカルシウム濃度の軽微な低下は、アルブミン濃度低下に関連して発現した可能性がある。投与終了時屠殺時（投与 180 日目）における 0.5 mg/kg 以上の群の雄でのグルコース濃度の軽微な低下及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌での血清尿素窒素濃度の軽微な上昇は、変化が小さく、関連する一般状態の変化又は病理組織学所見を伴わず、雌雄の一方のみで認められ、tirzepatide との関連は不明確であった。これらの変化は休薬期間終了時には認められなかった。尿検査パラメータにおいて、tirzepatide に関連した変化は認められなかった。

投与終了時剖検時の tirzepatide に関連した器官重量パラメータの変化は、概して tirzepatide 投与群の動物での著しい体重減少による二次的変化と考えられた。変化が認められた器官は、肝臓、腎臓、脳、脾臓、精巣上体、前立腺、心臓、胸腺、卵巣、副腎、甲状腺／上皮小体及び下垂体であった。休薬期間終了時の剖検では、tirzepatide に関連した器官重量パラメータの変化は認められなかった。

投与終了時屠殺時の tirzepatide に関連した病理組織学的所見は、主に体重及び／又は摂餌量の低下による二次的変化と考えられた。これらの所見は、0.5 mg/kg 以上の群で膵臓、脾臓、皮膚／皮下組織、大腿骨骨髄、副腎皮質（雄のみ）及び／又は心臓に認められた。

膵臓における tirzepatide に関連した病理組織学的所見は体重及び／又は摂餌量の低下による二次的変化と考えられ、その内訳は 0.5 mg/kg 以上の群での腺房細胞チモーゲン枯渇の発現頻度増加、1.5 mg/kg 以上の群の雄及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌でのびまん性萎縮並びに 0.5 mg/kg 以上の群の雄での膵島線維化の発現頻度減少及び／又は膵島内もしくは膵島近傍の色素の発現頻度減少であった。チモーゲン枯渇の特徴は、主に膵島から離れた腺房（膵島から最も遠い腺房）でのチモーゲン顆粒減少であり、膵島周囲腺房（膵島に最も近い腺房）でのチモーゲン顆粒滞留を伴う場合と伴わない場合があった。膵島周囲腺房細胞は膵島から外れた領域の腺房細胞と比較して枯渇に対する耐性がより高いことが知られており（Nolte et al. 2016）、その結果、膵島周囲領域がより明瞭になることが多い。膵臓のびまん性萎縮の特徴は、腺房細胞の小型化及び／又は膵管断面の増加であった。このほか、雌において小葉萎縮の発現頻度の増加が見られた。雄では tirzepatide に関連した小葉萎縮は認められなかった。小葉萎縮はこの月齢で一般的に認められる背景所見である。膵外分泌腺には体重及び／又は摂餌量の低下に関連した上述の病理組織学的所見（チモーゲン枯渇、びまん性委縮、膵島線維化及び膵島色素の発現頻度）が認められたことから、雌における小葉萎縮の発現頻度増加は体重及び／又は摂餌量の低下に関連して背景所見が悪化した可能性が考えられたが、明確な機序は不明である。

脾臓における髄外造血の発現頻度減少が、1.5 mg/kg 以上の群で認められた。この病理組織学的所見は脾重量パラメータ減少（体重減少に伴う）に寄与した可能性があり、それに関連して 0.5 mg/kg 以上の群では絶対網状赤血球数の軽度な減少が認められた。

皮膚／皮下組織では、脂肪細胞萎縮の発現頻度及び／又は重症度（軽微から中等度）の増加が、0.5 mg/kg 以上の群で発現した。脂肪細胞萎縮の特徴は、主に皮筋上の脂肪細胞の数減少及び／又は小型化であったが、筋肉の下の深部皮下組織でも同様の所見が散見された。萎縮した脂肪細胞では、顕著な細胞質好塩基性化が散見された。

大腿骨骨髄における脂肪細胞の軽微な減少が、0.5 mg/kg 以上の群の雌及び 3 mg/kg 群の雄 1 例で発現した。この変化の特徴は脂肪細胞の小型化及び／又は数減少であり、造血細胞の相対的増加によるものであった。

副腎皮質における空胞化の発現頻度及び／又は重症度の低下が、1.5 mg/kg 以上の群の雄で発現した。この変化の特徴は、主に束状帯における大滴性空胞の数減少（すなわち脂質空胞喪失に一致する）であった。

心臓では心筋症の発現頻度低下が 1.5 mg/kg 以上の群の雄及び 3 mg/kg 群の雌で認められ、摂餌量減少に一致する変化と考えられた（Kemi et al. 2000）。

休薬期間終了時剖検では、膵臓の小葉萎縮の発現頻度及び重症度の増加（雌のみ）を除いて、tirzepatide に関連した病理組織学的所見は認められなかった。休薬期間終了時剖検で雌の膵臓の小葉萎縮が引き続き認められたことは、投与終了時屠殺時の所見の形態（萎縮）を考慮すると予想外ではなく、この自然発生的背景所見の予想される進行と考えられた。このことは、対照群の雌でも小葉萎縮が休薬期間終了時剖検時に引き続き認められたことにより裏付けられる。

以上、tirzepatide をラットに 0、0.5、1.5 及び 3 mg/kg の用量で週 2 回、6 ヵ月間皮下投与したときの忍容性は良好であった。対照群と比較した体重増加量低下、摂餌量低下、関連する臨床検査値の変化、膵臓、脾臓、皮膚／皮下組織、大腿骨骨髄（雌のみ）及び副腎皮質（雄のみ）の病理組織学的所見並びに心筋症の発現頻度の低下が、0.5 mg/kg 以上の群で認められた。これらの所見はいずれも毒性変化ではないと考えられた。これらの所見は過剰な薬理作用で、GLP-1 受容体アゴニストを含むインクレチン薬について予想されるものと考えられ（Rossi and Nicolucci 2009）、獣医師による介入を必要としなかった。標的器官毒性は認められなかった。本試験における NOAEL は 3 mg/kg であり、同用量での投与 176 日目における C_{max} は雄及び雌でそれぞれ 5.58 及び 6.98 μg/mL、$AUC_{0\text{-}96hr}$ は雄及び雌でそれぞれ 257 及び 302 μg•hr/mL であった。

2.6.6.3.3　サル

2.6.6.3.3.1　サルを用いた 1 ヵ月間反復投与毒性試験

（添付資料 4.2.3.2.4、8325823 試験、概要表 2.6.7.7-4）

本試験（8325823 試験、概要表 2.6.7.7-4）の目的は、tirzepatide をカニクイザルに 1 ヵ月間（合計 5 回）投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価することであった。安全性薬理評価項目も評価した。

Tirzepatide を 1 群雌雄各 3 例のサルに 0、0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg の用量（0.1 mL/kg の投与容量）で週 1 回皮下投与した。

本試験の用量は、雌雄各 1 例に 0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg の用量で週 2 回皮下投与した 2 週間予備試験（8306340 試験）の結果に基づいて設定した。2 週間予備試験では 0.5 及び 1.5 mg/kg 群で試験を通して脱水が認められ、補水が必要であった。0.15 mg/kg 群の変化は軽度で、所見として摂餌量低下が各投与後に 2～3 日間認められた。以上の予備試験成績より、本試験で 0.5 mg/kg を高用量として投与した場合、体重増加量低下／体重減少、摂餌量低下及び皮下輸液による介入を必要とする可能性がある脱水が生じると予想された。低用量の 0.05 mg/kg では軽微な摂餌量の変化が生じると予想され、中用量の 0.15 mg/kg はほぼ対数中点であり、用量に関連した摂餌量及び体重の軽微な変化が生じると予想された。

死亡は認められなかった。Tirzepatide に関連した薬理学的に予想される摂取量低下並びに体重低下が、0.15 mg/kg 以上の群で認められた。0.05 mg/kg 群の雌では摂餌量低下が認められた。試験期間を通して、0.5 mg/kg 群の雄及び雌では、開始時体重と比較してそれぞれ 10%及び 15%の体重減少が認められた。Tirzepatide に関連した低摂餌量／無摂餌は、多くの場合、投与後 2 日以内に発現した。0.5 mg/kg 群の雌全例で、削痩が投与期間の 5 日目以降に認められた。0.5 mg/kg 群の雌 1 例では、脱水のため皮下輸液による介入が必要であった。この動物では低摂餌量及び体重減少を伴った低活動性及び削痩が認められた。0.5 mg/kg 群で見られたこれらの累積的変化は、獣医師の介入を必要としたことから毒性変化と考えられた。

心拍数増加傾向が、投与期間の 8 及び 22 日目の暗期（投与 8～19 時間後）に、0.15 mg/kg 群の雄（対照群との比較で最大で 20 bpm、18%）又は 0.5 mg/kg 群の雄（対照群との比較で最大で 24 bpm、22%）で認められた。心拍数増加には統計学的有意差は見られず、暗期のみに発現したが、用量依存性の変化が認められたことから、tirzepatide に関連した変化と考えられた。0.05 mg/kg 群の雄並びに 0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg 群の雌では、投与期間の 8 又は 22 日目に

tirzepatide に関連した心拍数の変化は認められなかった。Tirzepatide に関連した PR 間隔、QRS 持続時間、QT 間隔及び QTc 間隔の変化は認められなかった。心電図の定性的評価において、tirzepatide に関連した調律異常及び定性的な心電図の変化は認められなかった。

注射部位の所見は認められなかった。Tirzepatide に関連した眼科学的及び神経学的所見は認められなかった。定性的呼吸評価、呼吸数及び体温において、tirzepatide に関連した変化は認められなかった。臨床検査、器官重量の変化及び肉眼所見において、tirzepatide に関連した変化は発現しなかった。

Tirzepatide に関連した病理組織学的所見は、膵臓、大腿骨骨髄、心臓及び皮膚／皮下組織のみに認められた。膵臓のチモーゲン顆粒減少の特徴は、0.5 mg/kg 群の雄及び 0.15 mg/kg 以上の群の雌での膵外分泌腺の腺房細胞におけるチモーゲン顆粒の軽微な細胞質容積減少であった。大腿骨骨髄では、軽微から中等度の脂肪組織萎縮が 0.5 mg/kg 群の雄及び 0.15 mg/kg 以上の群の雌で発現し、その特徴は脂肪細胞の好酸性化、不規則性及び空胞変化であった。心臓及び皮膚／皮下組織では、0.05 mg/kg 以上の群の雌及び 0.15 mg/kg 以上の群の雄で軽微から中等度の脂肪組織萎縮が認められ、その特徴は主に心臓の心外膜脂肪組織及び／又は皮膚の皮下組織における脂肪細胞の小型化であった。Tirzepatide に関連した変化は、いずれも軽度で、摂餌量が減少した動物で特徴的に認められる変化であり（Kitagawa et al. 1986; Longnecker 2005）、tirzepatide による一次的な影響ではないことから、毒性変化ではないと考えられた。

以上、tirzepatide をカニクイザルに 0.5 mg/kg までの用量で週 1 回、1 ヵ月間皮下投与したところ、忍容性が認められた。標的器官毒性は認められなかった。0.15 mg/kg 以上の群で体重低下及び摂餌量低下が認められた。摂餌量及び体重の変化は過剰な薬理作用であり、GLP-1 受容体アゴニストを含むインクレチン薬について予想されるものであった（Rossi and Nicolucci 2009）。0.5 mg/kg 群の雌 1 例では、過剰な薬理作用の結果として対症的な皮下補液投与が必要になったことから、この用量は毒性用量と考えられた。本試験における NOAEL は 0.15 mg/kg であり、同用量での 29 日目における C_{max} は雄及び雌でそれぞれ 1.21 及び 1.51 µg/mL、$AUC_{0\text{-}168hr}$ は雄及び雌でそれぞれ 105 及び 124 µg•hr/mL であった。

2.6.6.3.3.2　サルを用いた 6 ヵ月間反復投与毒性試験及び 4 ヵ月間回復試験

（添付資料 4.2.3.2.5、8336517 試験、概要表 2.6.7.7-5）

本試験（8336517 試験、概要表 2.6.7.7-5）の目的は、tirzepatide をカニクイザルに 6 ヵ月間投与したときの毒性及びトキシコキネティクスを評価するとともに、変化が認められた場合の 4 ヵ月間の休薬期間後の回復性を評価することであった。心血管系機能の評価項目も評価した。

Tirzepatide を雌雄のサルに 0、0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg の用量（0.1 mL/kg の投与容量）で週 1 回、6 ヵ月間皮下投与した。投与終了時屠殺群は 1 群雌雄各 4 例とし、対照群及び 0.5 mg/kg 群の雌雄各 3 例について投与終了後の休薬期間を設けた。

高用量の 0.5 mg/kg は、tirzepatide をサルに 0、0.05、0.15 及び 0.5 mg/kg の用量で週 1 回皮下投与した 1 ヵ月間反復投与毒性試験（8325823 試験）の結果に基づいて設定した。1 ヵ月試験で見られた tirzepatide に関連した変化は、GLP-1 受容体アゴニストの薬理作用に一致するか又はそれによる二次的変化であり、その内訳は摂餌量低下、体重増加量低下／体重低下及び脱水であった。高用量群の 1 例では皮下輸液による介入が必要であったため、高用量の 0.5 mg/kg は MTD と判断

され、中用量の 0.15 mg/kg は 1 ヵ月試験の NOAEL と判断された。しかしながら、いずれの用量においても重要な病理学的所見は認められなかったこと、また 6 ヵ月試験では tirzepatide に関連した過剰な薬理作用に起因する獣医師介入の必要性を低減するため、水分の多い果物及び野菜並びに経口補水液の提供が予定されていたことから、6 ヵ月間反復投与毒性試験の高用量として 0.5 mg/kg が適切と判断された。

死亡は認められなかった。投与終了時屠殺時の剖検で毒性所見が認められなかったことから、休薬期間終了時剖検は必要ないと考えられた。回復性試験群のサルは、休薬期間終了後に試験施設のストックコロニーに移した。休薬期間の評価は、体重、摂餌量、一般状態観察及びトキシコキネティクスのみとした。

Tirzepatide に関連した眼科学的所見は認められなかった。

Tirzepatide に関連した薬理学的に予想される摂餌量低下及び体重増加量低下が認められた。Tirzepatide に関連した体重減少が、0.5 mg/kg 群で投与期間の最初の 12 日間を通して認められた。残りの投与期間中、散発的な体重低下がすべての群で認められたが、一貫した法則性は認められなかった。しかしながら、投与期間を通した体重増加量は 0.05 mg/kg 以上の群の雄で有意に少なく、0.5 mg/kg 群の雌でも有意ではないものの低かった。対照群と比較した低摂餌量又は無摂餌の発現頻度増加が、0.5 mg/kg 群の雄及び 0.15 mg/kg 以上の群の雌で投与期間中に認められた。低摂餌量は体重増加量低下と相関していた。

0.15 及び 0.5 mg/kg 群で、脱水が試験 34 日目まで認められたが、いずれの動物も獣医師による介入は必要としなかった。

休薬期間中、一般状態の変化及び体重変化の重要な群間差は認められなかった。

0.15 又は 0.5 mg/kg の用量での投与に関連して、心拍数増加が、主に投与期間の 8、78 又は 169 日目の暗期（投与 8～19 時間後）に認められ、最大で 0.15 mg/kg 群で 19 bpm（18%）、0.5 mg/kg 群で 31 bpm（30%）の対照群との差が見られた。0.05 mg/kg 群では、8、78 及び 169 日目に tirzepatide に関連した心拍数の変化は認められなかった。Tirzepatide に関連した心拍数増加に起因する QT 間隔の変化が認められたが、これは心拍数への影響による二次的変化と考えられた。いずれの群でも tirzepatide に関連した PR、QTc 間隔及び QRS 持続時間の変化は認められず、tirzepatide に関連した調律異常及び定量的心電図変化も認められなかった。

投与終了時屠殺までの臨床検査で見られた唯一の tirzepatide に関連した変化は、投与 85 及び 183 日目に 0.05 mg/kg 以上の群の雄で認められた軽度の尿量増加であった。しかしながら、腎障害／機能異常を示す臨床検査所見及び病理学的所見が認められなかったことから、この軽度な変化は毒性学的に重要ではないと考えられた。投与終了時屠殺時の血液学的検査、血液凝固検査及び血液生化学的検査では、tirzepatide に関連した変化は認められなかった。

投与終了時屠殺時の tirzepatide に関連した病理組織学的所見は膵臓のみで認められ、その所見は 0.5 mg/kg 群の雌 2 例におけるチモーゲン顆粒の軽微な減少であった。この所見に関連して 0.5 mg/kg 群の雌で低摂餌量の発現頻度増加が認められたが、関連する臨床検査所見が認められず、重症度も軽微であったことから、毒性変化ではないと考えられた。投与終了時屠殺時において、tirzepatide に関連した肉眼所見及び器官重量パラメータの変化は認められなかった。

以上、tirzepatide をカニクイザルに 0.5 mg/kg までの用量で週 1 回、6 ヵ月間皮下投与したところ、忍容性が認められた。標的器官毒性は認められなかった。Tirzepatide に関連した体重低下が

認められ、摂餌量低下と関連していた。体重増加量の有意な低下が 0.05 mg/kg 以上の群の雄で認められ、0.5 mg/kg 群の雌でも有意ではないものの低下が認められた。すべての tirzepatide に関連した変化は過剰な薬理作用と考えられ、GLP-1 受容体アゴニストを含むインクレチンアゴニストで予想されるものであり（Rossi and Nicolucci 2009）、獣医師による介入は必要なかった。本試験における NOAEL は 0.5 mg/kg であり、同用量での 176 日目における C_{max} は雄及び雌でそれぞれ 4.19 及び 4.58 µg/mL、$AUC_{0\text{-}168hr}$ は雄及び雌でそれぞれ 342 及び 331 µg•hr/mL であった。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

ICH S6 (R1) に従い、tirzepatide について変異原性評価は実施しなかった。

Tirzepatide は非天然型アミノ酸及びリンカー構造を含むことから、その遺伝毒性を評価するため、in vivo 小核試験を実施した。In vivo 小核試験を選択した理由は、同試験が代謝等の in vitro 試験系では反映されない機序を含めて評価可能なためであり、この選択は化学合成ペプチドに関する健康保健科学研究所（Health and Environmental Sciences Institute：HESI）遺伝毒性技術委員会ワークグループの推奨（Thybaud et al. 2016）とも一致する。

2.6.6.4.1　ラット骨髄小核試験

（添付資料 4.2.3.3.2.1、8395235 試験、概要表 2.6.7.9-1）

本試験（8395235 試験、概要表 2.6.7.9-1）の目的は、ラットの骨髄の多染性赤血球（polychromatic erythrocytes：PCE）における tirzepatide の小核（micronuclei：MN）誘導能を評価することであった。

1 群雄 6 例の Sprague Dawley ラットに tirzepatide を 0、0.75、1.5 及び 3 mg/kg の用量で単回皮下投与し、投与 24 時間後に骨髄を採取した。別の 6 例の雄ラットに 3 mg/kg の用量で単回皮下投与し、投与 48 時間後に骨髄を採取した。

高用量の 3 mg/kg は、3 例の雄ラットからなる 1 群に 3 mg/kg の用量で皮下投与した用量設定予備試験で決定された MTD であった。一般状態の毒性変化として立毛及び活動性低下が終日認められ、約 16%の著しい体重低下が認められた。20%以上の体重低下は重度の事象及び死亡のリスクを示していると考えられるため、3 mg/kg の用量は妥当な MTD 推定値と考えられた。

いずれの tirzepatide 投与群においても、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な小核頻度の増加は認められず、すべての tirzepatide 投与ラットの個体別の小核を有する多染性赤血球の発現頻度（%MN PCE）は溶媒対照の背景値の範囲と一致しており、溶媒対照群内で認められた値と同程度であった。これらのデータから、tirzepatide は MN 誘導作用を有さないことが示された。

以上、tirzepatide を 3 mg/kg（本試験の MTD）までの用量で雄ラットに投与したところ、骨髄の PCE において小核を誘導しなかった。

2.6.6.5　がん原性試験

2.6.6.5.1　RasH2 マウスを用いた 26 週間がん原性試験

（添付資料 4.2.3.4.2.1、8392063 試験、概要表 2.6.7.10-1）

本試験（8392063 試験、概要表 2.6.7.10-1）の目的は、tirzepatide を 001178-T（ヘミ接合）RasH2 マウスに週 2 回、26 週間以上皮下投与したときのがん原性の有無を評価するとともに、001178-W

（野生型）RasH2 マウスに週 2 回皮下投与したときの tirzepatide のトキシコキネティクスを検討することであった。

雌雄のマウスに tirzepatide を 0、1、3 及び 10 mg/kg の用量（10 mL/kg の投与容量）で週 2 回皮下投与した。10 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム及び 0.02%ポリソルベート 80（pH 7.0 ± 0.2）を投与した群を溶媒対照とした。がん原性試験群は 1 群雌雄各 25 例とした。トキシコキネティクス評価のためのサテライト群として、tirzepatide 群には雌雄各 51 例、対照群には雌雄各 21 例のマウスを割り付けた。別の雌雄各 10 例のマウスに、陽性対照の N-メチル-N-ニトロソウレア（MNU）を単回投与した。投与 5 又は 6 日目以降、10%以上の体重減少を示したマウスには飲料ボトルを、18%以上の体重減少を示したマウスには栄養補給食（DietGel）をそれぞれ供した。これらの補給は投与期間終了時まで継続した。

試験動物種として 001178-T（ヘミ接合）RasH2 マウスを選択した理由は、短期がん原性試験のためのトランスジェニックマウスモデルとして広く認められているためである（ICH S1B; Storer et al. 2010）。Tirzepatide のトキシコキネティクス評価には 001178-W（野生型）RasH2 マウスを用いた。

本試験の用量は、tirzepatide を 0、1、3 及び 30 mg/kg の用量で 00178-W（野生型）RasH2 マウスに週 2 回皮下投与した 4 週間試験（8376621 試験）の成績に基づいて設定した。すなわち、予備試験の 30 mg/kg 群において過剰な体重減少及び／又は体重増加量低下が生じたため、本試験の高用量を 10 mg/kg に設定した。中及び低用量はそれぞれ 3 及び 1 mg/kg とした。

投与経路、動物種及び用量設定を含む試験計画書は、米国食品医薬品局（FDA）の発がん性評価委員会（eCAC）の審査を受けて同意を得た。

Tirzepatide は生存に対して負の影響を及ぼさず、途中死亡は偶発的なものと考えられた。投与期間終了時（26 週目）における tirzepatide 投与群の生存率は、雄が 96%以上、雌が 92%以上であり、溶媒対照群の生存率は 92%以上であったことから、投与期間終了時まで生存した動物の数は tirzepatide のがん原性を評価するのに十分であった。陽性対照物質は生存率に影響を及ぼし、生存率は雄が 10%、雌が 0%であった。

すべての用量で有意な体重低下及び摂餌量低下が認められたのに加えて、tirzepatide に関連した一般状態の変化として、削痩及び円背位が認められた。これらの所見は栄養補給にもかかわらず認められた。

投与期間中、眼科学的検査において tirzepatide に関連した異常は認められなかった。

計画屠殺時まで生存したマウスにおける tirzepatide に関連した臨床検査の変化には、概して明確な用量依存性は認められなかった。主要な血液学的変化として、軽微な赤血球量減少及び中等度の白血球（好中球、リンパ球、単球及び好酸球）数減少が認められた。血液生化学的変化として、軽微なタンパク濃度の変化（アルブミン増加、グロブリン減少）、軽度のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性減少及び軽度の ALP 活性増加が認められた。赤血球数パラメータ及び白血球数の変化は造血減少に一致しており、体重及び／又は摂餌量の低下に関連して生じた可能性がある。残りの変化の機序は特定されなかったが、これらも体重及び／又は摂餌量の低下に関連して生じた可能性がある。

統計解析では、10 mg/kg までの投与を受けたマウスで認められた腫瘍の発現頻度及び腫瘍の種類に関して、tirzepatide に関連した変化は認められなかった。対照群及び tirzepatide 投与群で発現

した腫瘍の種類は自然発症的な腫瘍として一般的に報告されているものであり、6 ヵ月間試験において RasH2 マウスモデルで認められる自然発生的な背景所見と一致していた。

陽性対照投与群で見られた腫瘍性の病理組織学的所見は、MNU 投与後の RasH2 トランスジェニックマウスモデルで認められる典型的な所見であり（Takaoka et al. 2003）、本試験の妥当性が示された。高頻度に認められた MNU に関連した腫瘍は、悪性リンパ腫及び扁平上皮乳頭腫又は扁平上皮癌（皮膚及び／又は胃）であった。

Tirzepatide に関連した非腫瘍性の病理組織学的所見が、3 mg/kg 以上の群で肝臓に発現し、1 mg/kg 以上の群で皮膚／皮下組織、注射部位、胸腺、顎下腺、卵巣及び子宮に発現したが、これらは体重低下及び／又は摂餌量低下による二次的変化と考えられた（Thoolen et al. 2010; Everds et al. 2013; Nolte et al. 2016）。

3 mg/kg 以上の群では、肝臓において tirzepatide に関連した肝細胞グリコーゲン減少（軽微から軽度）の発現頻度及び／又は重症度上昇が認められた。肝細胞グリコーゲン減少の特徴は、肝細胞の細胞質における境界不明瞭なレース状の透明腔又は空胞化の欠如であり、体重低下、摂餌量低下及び／又は代謝の変化による二次的変化と考えられた。

1 mg/kg 以上の群における tirzepatide に関連した所見として、皮膚／皮下組織並びに皮下注射部位における脂肪細胞萎縮（軽微から軽度）の発現頻度及び／又は重症度上昇並びに胸腺におけるアポトーシスの増加（軽微）が認められた。脂肪細胞萎縮の特徴は、皮膚の深部真皮／皮下組織又は注射部位における脂肪細胞の数減少及び小型化であった。アポトーシス増加の特徴は、胸腺皮質における濃縮又は断片化したリンパ球核及び／又は可染体マクロファージ数の増加であった。

1 mg/kg 以上の群の雌における tirzepatide 関連の病理組織学的所見として、軽微から軽度の顎下腺分泌管枯渇、卵巣の黄体減少及び子宮の萎縮が認められた。顎下腺の分泌枯渇の特徴は、顆粒管における好酸性顆粒の減少であった。卵巣の黄体減少の特徴は、活動性黄体及び変性黄体の減少又は完全な欠如であった。子宮萎縮の特徴は、子宮内膜及び筋層の厚さの減少であった。

以上、001178-T（ヘミ接合）RasH2 マウスに tirzepatide を 10 mg/kg までの用量で週 2 回、26 週間皮下投与したところ、tirzepatide に関連したがん原性変化は認められなかった。Tirzepatide に関連した体重増加量低下又は体重低下及び摂餌量低下が、すべての用量で認められた。10 mg/kg 群の 001178-W（野生型）RasH2 マウスにおける 26 週目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}96hr}$ は、雄でそれぞれ 45.7 µg/mL 及び 1520 µg•hr/mL、雌でそれぞれ 53.1 µg/mL 及び 1530 µg•hr/mL であった。

2.6.6.5.2　ラットを用いた 2 年間がん原性試験

（添付資料 4.2.3.4.1.1、8392734 試験、概要表 2.6.7.10-2）

本試験（8392734 試験、概要表 2.6.7.10-2）の目的は、tirzepatide をラットに週 2 回、約 104 週間皮下投与したときのがん原性の有無を評価するとともに、トキシコキネティクスを検討することであった。

Tirzepatide を雌雄の Sprague Dawley ラットに 0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg の用量（1 mL/kg の投与容量）で週 2 回皮下投与した。10 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム及び 0.02%ポリソルベート 80（pH 7.0 ± 0.2）を投与した群を溶媒対照とした。がん原性試験群は 1 群雌雄各 60 例とした。トキシコキネティクス評価のためのサテライト群として、tirzepatide 群には雌雄各 18 例、対照群には雌雄各 6 例のラットを割り付けた。

用量設定は、ラットに tirzepatide を 0、0.5、1.5 及び 3 mg/kg の用量で週 2 回皮下投与した 6 ヵ月間試験に基づいて行った（8337876 試験）。3 mg/kg で過剰な体重低下及び／又は体重増加量低下が認められ、その結果、一般状態の変化として円背位が認められたことから、高用量として 1.5 mg/kg を設定した。中及び低用量はそれぞれ 0.5 及び 0.15 mg/kg とした。

投与経路、動物種及び用量設定を含む試験計画書は、FDA eCAC の審査を受けて同意を得た。

Tirzepatide に関連した死亡は発現せず、対照群と比較して、tirzepatide は生存に対する負の影響を示さなかった。対照群の生存例数が少なかった（雌雄各 20 例以下）ことから、FDA eCAC の推奨に従い、生存例の雌を 588 日目（84 週目）に、雄を 614 日目（88 週目）に、それぞれ早期屠殺した。588 日目の早期計画屠殺時における雌の生存例数は、0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg 群でそれぞれ 20、30、28 及び 37 例、614 日目の早期計画屠殺時における雄の生存例数は、0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg 群でそれぞれ 19、30、27 及び 20 例であった。雄の死亡率には、群間で統計学的有意差は認められなかったが、雌の 0.15 及び 1.5 mg/kg 群の死亡率は対照群と比較して統計学的に有意に低く、傾向検定でも統計学的有意差が認められた。

Tirzepatide に関連した体重増加量、体重及び摂餌量の低下がすべての用量で認められた。これらの減少は栄養補給にもかかわらず発現し、GLP-1 受容体アゴニストを含むインクレチン薬で予想される過剰な薬理作用であった（Rossi and Nicolucci 2009）。Tirzepatide に関連した一般状態の変化は、1.5 mg/kg 群で認められた削痩のみであった。

Tirzepatide に関連した腫瘍性所見は甲状腺のみに認められた。雌雄の甲状腺で、tirzepatide に関連した C 細胞腫瘍の発現頻度増加が認められた。その内訳は、0.15 mg/kg 以上の群における C 細胞腺腫並びに 0.15 mg/kg 以上の群の雄及び 1.5 mg/kg 群の雌での C 細胞癌の発現頻度増加であった。雌雄での C 細胞腺腫の発現頻度及び雌雄での C 細胞腺腫と C 細胞癌を併合した発現頻度は、すべての用量でそれぞれの対照と比較して統計学的有意差が認められ、統計学的に有意な傾向も雌雄で認められた。C 細胞癌の発現頻度増加において統計学的有意差が認められたのは 0.5 mg/kg 群の雄のみであり、その傾向には統計学的有意差は認められなかった。雌では C 細胞癌の発現頻度について統計学的に有意な傾向が認められたが、1.5 mg/kg 群の雌における発現頻度増加に統計学的有意差は見られなかった。甲状腺腫瘍に関連する肉眼所見として、嚢胞、変色、大型化及び／又は腫瘤形成が高頻度に認められた。

Tirzepatide に関連した非腫瘍性所見が、甲状腺（限局性 C 細胞過形成）、副腎（球状帯のびまん性肥大／過形成）及び皮膚／皮下組織（脂肪組織萎縮）に認められた。

軽微から重度の限局性 C 細胞過形成が甲状腺に認められ、0.15 mg/kg 以上の群で発現頻度及び／又は重症度が増加した。限局性 C 細胞過形成に関連する肉眼所見は認められなかった。限局性 C 細胞過形成は片側性又は両側性に発現し、その特徴は濾胞間部位に隙間なく巣状に配列した C 細胞の限局性凝集であり、隣接する組織を圧迫せず、被膜形成は認められなかった。細胞は多角形で細胞質は蒼白から両染性であり、細胞境界は不明瞭で、核はおおむね円形から卵円形で中央に位置していた。限局性 C 細胞過形成は前腫瘍病変と考えられる（Brändli-Baiocco et al. 2018）。高齢のラットで高頻度に認められるびまん性 C 細胞過形成には、用量に関連した増加は認められなかった。

副腎における球状帯びまん性肥大／過形成の発現頻度増加が 0.15 mg/kg 以上の群の雄（軽微から軽度）及び 0.5 mg/kg 以上の群の雌（軽微から中等度）で認められた。これは tirzepatide に関連

した変化であり、薬理作用による摂餌量及び摂水量の低下（Chatelain et al. 2003）に対する代償性変化と考えられた。球状帯の肥大／過形成に関連する肉眼所見は認められなかった。びまん性肥大／過形成の特徴は球状帯のびまん性かつ両側性の肥厚であった。それは細胞の大型化（細胞質量の増加）及び細胞数増加によるものであり、細胞質は泡沫状又は細かい空胞を呈していた。球状帯の限局性肥大／過形成は高頻度に認められたが、対照群と比較して発現頻度及び重症度の増加はなく、用量依存性も認められなかった。

皮膚における皮下脂肪組織萎縮（軽微から中等度）がすべての群で認められ、発現頻度及び重症度が増加した。これは tirzepatide に関連した変化と考えられ、その薬理作用から予想される変化であった。皮下注射部位以外の箇所から採取した皮膚／皮下組織切片における脂肪萎縮の特徴として、皮下組織内脂肪細胞の細胞質の面積がより少なく、細胞膜がより顕著であったのに対し、皮下注射部位における脂肪萎縮はより容易に認知され、その特徴は真皮と筋層の間の脂肪組織層の菲薄化であり、ほとんど認められない場合もあった。

以上、tirzepatide を雌雄のラットに 0.15、0.5 又は 1.5 mg/kg の用量で週 2 回、84 週間以上皮下投与したときの忍容性は良好であった。所見として、体重増加量低下、体重低下、摂餌量低下及び甲状腺の C 細胞腫瘍が、すべての用量で認められた。Tirzepatide の 1.5 mg/kg までのいずれの投与群においても、その他の腫瘍性所見は認められなかった。甲状腺 C 細胞腺腫及び C 細胞癌の発現頻度増加が見られたことから、この生涯投与によるラットがん原性試験の無影響量は決定できなかった。Tirzepatide により甲状腺 C 細胞で認められた過形成性及び腫瘍性の反応は、長時間作用型 GLP-1 受容体アゴニストについて甲状腺で報告された所見に一致していた（Bjerre Knudsen et al. 2010; Byrd et al. 2015）。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

雌雄の受胎能、胚・胎児発生並びに出生前及び出生後の発生に対する tirzepatide の影響の有無を評価するため、ラットを用いた試験を実施した。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験も実施した。各試験において、臨床投与経路である皮下注射により tirzepatide を投与した。反復投与毒性試験と同様に、溶媒には 10 mM トリス、150 mM 塩化ナトリウム、0.02%ポリソルベート 80（pH 7.0 ± 0.2）を用いた。Tirzepatide の投与液中濃度は、用量及び提供された被験物質の濃度に応じて、0.1～5 mg/mL の範囲であった。Sprague Dawley ラット及びニュージーランドホワイトウサギを生殖発生毒性試験用に選択した。これらの動物種のいずれにおいても、体重及び摂餌量に対する tirzepatide に関連した薬理作用が示されている。生殖発生毒性試験において器官形成期を通した十分な曝露量を確保するため、tirzepatide のウサギへの投与は単回投与薬物動態試験（CTD 第 2.6.4.3.1 項）に基づいて週 1 回とし、ラットでは全身曝露量を最大化するため、週 2 回投与とした。

2.6.6.6.1　ラットを用いた雄の受胎能に関する試験

（添付資料 4.2.3.5.1.1、00353430 試験、概要表 2.6.7.12-1）

本試験（00353430 試験、概要表 2.6.7.12-1）の目的は、tirzepatide を雄ラットに交配前（4 週間）から交配期間を通して計画屠殺時まで投与（合計 19 回）したときの生殖腺機能、交配及び受胎

能に対する影響の有無を検討することであった。評価項目は、精子検査、生殖能及び生殖器官重量とした。

Tirzepatide を 1 群 25 例の雄ラットに 0、0.5、1.5 及び 3 mg/kg の用量（1 mL/kg の投与容量）で週 2 回、6 週間皮下投与した。1 群 9 例（tirzepatide 群）及び 3 例（対照群）のラットをトキシコキネティクス評価に割り付けた。雄の受胎能を評価するため、主試験のラットを同じ系統の無処置雌と交配させた。高用量の 3 mg/kg は、ラット 6 ヵ月間反復投与毒性試験（8337876 試験）における高用量と同じ用量とした。

死亡及び tirzepatide に関連した一般状態の変化は認められなかった。

Tirzepatide に関連した体重低下及び／又は体重増加量低下並びに対応する摂餌量低下が、すべての tirzepatide 投与群で試験を通して認められた。体重は、試験 3 日目以降、投与終了時屠殺時まで継続して対照群を下回った。0.5、1.5 及び 3 mg/kg 群の体重は、それぞれ最大で対照群を 13.3%、20.1%及び 21.7%下回った。体重及び摂餌量の変化は tirzepatide の予想される薬理作用に起因するものであったが、その重症度により、毒性変化と考えられた。

いずれの用量においても、雄の交尾率及び受胎率には tirzepatide に関連した変化は認められなかった。いずれの用量においても、精子形成パラメータに tirzepatide に関連した変化は認められず、妊娠 15 日目の剖検時に胚の子宮内生存への影響も認められなかった。

剖検において、いずれの用量においても、tirzepatide に関連した肉眼所見は認められなかった。1.5 及び 3 mg/kg 群の脳及び精巣上体重量が低下したが、これらは tirzepatide に関連した体重低下による二次的変化と考えられた。

以上、すべての tirzepatide 投与群で体重、体重増加量及び／又は摂餌量の重度の低下が認められたことから、雄の全身毒性に関する NOAEL は決定できなかった。Tirzepatide のいずれの用量においても、生殖能及び子宮内生存への影響は認められなかった。本試験における雄の生殖毒性及び初期胚毒性に関する NOAEL は 3 mg/kg であり、同用量での 28 日目における C_{max} は 9.11 µg/mL、$AUC_{0\text{-}72hr}$ は 241 µg•hr/mL であった。

2.6.6.6.2　ラットを用いた雌の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

（添付資料 4.2.3.5.1.2、WIL-353356 試験、概要表 2.6.7.12-2）

本試験（WIL-353356 試験、概要表 2.6.7.12-2）の目的は、tirzepatide を雌ラットに交配前（14 日間）から受胎を通して着床まで投与したときの生殖過程への影響の有無を検討することであった。本試験の評価項目は、性周期、交配、受胎能、着床前及び着床後の初期胚発生とした。

Tirzepatide を 0、0.5、1.5 及び 3 mg/kg の用量（1 mL/kg の投与容量）で交配前 2 週間（試験 0、4、7、11 及び 14 日目）、交尾が確認されるまでの交配期間中［試験 18、21、25 及び 28（必要に応じて）日目］並びに妊娠 6 日目まで（妊娠 3 及び 6 日目）に週 2 回皮下投与した。雌ラットを妊娠 15 日目に安楽殺し、母動物の生殖パラメータ及び胚生存性を評価した。主試験群は 1 群 20 例とした。1 群 4 例からなるサテライト群のラットをトキシコキネティクス評価に割り付けた。高用量の 3 mg/kg は、ラット 6 ヵ月間反復投与毒性試験（8337876 試験）の高用量と同じ用量とした。

Tirzepatide に関連した死亡は認められなかった。Tirzepatide に関連した一般状態の変化として、鼻周囲の赤色物質がすべての用量で、糞排泄減少が 3 mg/kg の用量で、それぞれ認められた。

Tirzepatide に関連した体重増加量低下又は体重減少及び対応する摂餌量の変化が、すべての投与群の雌で交配前期間（試験 0～14 日目）を通して認められた。その結果、試験 14 日目における 0.5、1.5 及び 3 mg/kg 群の体重は、対照群と比較して、それぞれ 5.7%、8.9%及び 9.7%少なかった。妊娠投与期間中の tirzepatide 投与群の体重増加量は対照群と同程度又はわずかに多かったが、この期間中の摂餌量は対照群より少なかった。これらの群での妊娠投与後期間中（妊娠 10～15 日目）の体重増加量及び摂餌量は対照群より多かったが、妊娠 15 日目の体重は、それぞれ対照群と比較して 5.0%、4.4%及び 4.1%少なかった。

0.5、1.5 及び 3 mg/kg 群では、6 日以上の性周期長を示す個体、又は発情間期の持続・延長のため性周期長を算出できない個体の数が増加した。これは tirzepatide に関連した影響ではあるものの、すべての投与群で見られた摂餌量及び体重低下による二次的変化と考えられた（Terry et al. 2005）。また、tirzepatide に関連した黄体数及び着床数の減少並びにそれによる生存胚数の減少が、すべての投与群で認められた。これらの変化も体重減少及び摂餌量減少による二次的変化と考えられた。いずれの用量においても、交尾率及び受胎率、並びに着床前及び着床後胚損失率には、tirzepatide に関連した変化は認められなかった。

以上、すべての用量で体重増加量、摂餌量、性周期、黄体数、着床数及び生存胚数において毒性変化が認められたことから、tirzepatide をラットに週 2 回皮下投与したときの雌の全身毒性、生殖毒性及び初期胚毒性に関する NOAEL は決定できなかったが、交尾率及び受胎率、交尾所要期間並びに着床前及び着床後胚損失率への影響は認められなかった。

2.6.6.6.3　ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験

（添付資料 4.2.3.5.2.2、WIL-353354 試験、概要表 2.6.7.13-1）

本試験（WIL-353354 試験、概要表 2.6.7.13-1）の目的は、ラットの胚及び胎児の発育、生存性及び形態に対する tirzepatide の影響の有無を検討することであった。

Tirzepatide を交尾確認雌ラット（1 群 25 例）に 0、0.02、0.1 及び 0.5 mg/kg の用量（0.2 mL/kg の投与容量）で、妊娠 6、10、13 及び 17 日目に皮下投与した。ラットを妊娠 20 日目に安楽殺し、母動物の生殖パラメータを評価するとともに、胎児の生存性、体重、性別及び形態を評価した。1 群 4 例からなるサテライト群のラットをトキシコキネティクス評価に割り付けた。

高用量の 0.5 mg/kg は、妊娠ラットを用いた胚・胎児発生及びトキシコキネティクス予備試験（WIL-353352 試験）の結果に基づいて設定した。この試験では、妊娠 6、10、13 及び 17 日目に、tirzepatide を 0、0.1、0.5、1.5 及び 3 mg/kg（1 群雌 5 例）の用量で皮下投与した。0.5 mg/kg 以上の用量で母動物体重、体重増加量及び摂餌量の有意な低下が認められた。1.5 及び 3 mg/kg の用量は妊娠ラットの MTD を超えていた。0.5 mg/kg 以上で早期吸収胚数が増加し、すべての tirzepatide 投与群で胎児体重が有意に低下した。また、1.5 及び 3 mg/kg 群では、曲尾、短尾、欠指及び短指といった外表奇形の発現頻度が増加した。0.5 mg/kg の用量は妊娠ラットにおける MTD であった。

Tirzepatide に関連した死亡は認められなかった。主試験の雌全例が妊娠 20 日目の計画剖検まで生存した。Tirzepatide に関連した糞排泄減少が、0.1 及び 0.5 mg/kg 群で認められた。

Tirzepatide に関連した体重低下又は体重増加量低下が、0.1 及び 0.5 mg/kg 群で、各投与日の 1～2 日後に認められ、毒性変化と考えられた。投与後 3 日目の体重増加量は、おおむね溶媒対照群より多いか又は同程度であった。初期変化の結果として、0.1 及び 0.5 mg/kg 群の体重は、試験

を通して溶媒対照群よりそれぞれ最大で 11.6%及び 21.4%少なかった。これらの群の摂餌量は、投与期間を通して溶媒対照群より少なかった。0.1 及び 0.5 mg/kg 群の妊娠子宮重量を除いた妊娠 20 日目の体重及び体重増加量は溶媒対照群より有意に少なかった。0.5 mg/kg 群では妊娠子宮重量が溶媒対照群より少なかった。0.1 mg/kg 群の妊娠子宮重量には tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

0.02 mg/kg 群では、体重低下又は体重増加量低下及び対応する摂餌量低下が、最初の 3 回の投与の 1 又は 2 日後に認められた。非投与期間（投与日の間の期間）における同群の体重増加量及び摂餌量は溶媒対照群の値と同程度又はより多かった。0.02 mg/kg の用量での体重増加量及び摂餌量の低下幅は体重に毒性的な影響を及ぼす程ではなかったことから、tirzepatide に関連した変化ではあるが毒性ではないと考えられた。0.02 mg/kg 群の妊娠子宮重量を除いた妊娠 20 日目の体重及び体重増加量並びに妊娠子宮重量には、tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

いずれの用量においても、tirzepatide に起因する母動物の肉眼所見は認められなかった。

Tirzepatide に関連した胎児体重低下が 0.5 mg/kg 群で溶媒対照群と比較して認められ、その結果、この群の妊娠子宮重量は低下した。0.02 及び 0.1 mg/kg 群の胎児の子宮内発育並びに 0.02、0.1 及び 0.5 mg/kg 群の胎児の生存性には、母動物への tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

外表、内臓及び骨格奇形並びに内臓及び骨格変異の発現頻度増加が 0.5 mg/kg で認められ、これらは tirzepatide に関連した変化と考えられた。0.5 mg/kg で認められた大半の外表、内臓及び骨格奇形の発現頻度は試験実施施設（[redacted]）の背景対照データ範囲内であったが、0.5 mg/kg 群で変化が認められた胎児の数は明らかに増加していたことから、これらの奇形は tirzepatide に関連した変化と考えられた。この群で認められた外表奇形の内訳は胎児全身浮腫、吻様鼻、小口及び無眼球、内臓奇形の内訳は内臓逆位、重複大動脈、心室中隔欠損及び肺の小葉発育不全、骨格奇形の内訳は肋骨及び肋軟骨の異常並びに四肢骨弯曲であった。主要血管変異の発現頻度増加が 0.5 mg/kg で認められた。第 5 及び／又は 6 胸骨分節未骨化、第 1、2、3 及び／又は 4 胸骨分節未骨化、第 13 肋骨、頭蓋骨及び椎弓の骨化不全並びに舌骨未骨化といった骨格変異の発現頻度の増加が 0.5 mg/kg 群の胎児で認められた。この群では変異である第 1 頸椎椎体骨化の発現頻度減少も認められ、溶媒対照群と比較して有意差が認められた。これらの変異は、この用量での胎児体重減少による二次的変化と考えられた。

0.02 mg/kg 群の 1 胎児で、内臓逆位（気管、食道、心臓、肝臓、胃、膵臓、脾臓、腎臓、副腎及び腸の側方転移）、心室中隔欠損、肺の小葉発育不全及び大静脈位置異常（正常より側方に走行）が認められた。これらの奇形を含むいずれの奇形も 0.1 mg/kg 群では認められなかったことから、0.02 mg/kg 群で見られた奇形は tirzepatide に関連した影響ではないと考えられた。

以上、0.1 及び 0.5 mg/kg の用量で母動物体重低下並びに対応する摂餌量低下及び糞排泄減少が認められたことから、母動物毒性に関する NOAEL は 0.02 mg/kg であった。0.5 mg/kg で胎児体重低下並びに奇形及び変異の発現頻度増加が認められたことから、胚・胎児発生に関する NOAEL は 0.1 mg/kg であり、同用量での妊娠 17 日目における AUC_{last} 及び C_{max} は、それぞれ 4010 ng•hr/mL 及び 174 ng/mL であった。

2.6.6.6.4　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

（添付資料 4.2.3.5.2.4、WIL-353355 試験、概要表 2.6.7.13-2）

本試験（WIL-353355 試験、概要表 2.6.7.13-2）の目的は、ウサギの胚及び胎児の発育、生存性及び形態に対する tirzepatide の影響の有無を検討することであった。

Tirzepatide を交尾確認雌ウサギ（1 群 22 例）に、0、0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg の用量（0.1 mL/kg の投与容量）で妊娠 7 及び 14 日目に皮下投与した。ウサギを妊娠 29 日目に安楽殺し、母動物の生殖パラメータ並びに胎児の生存性、体重、性別及び形態を評価した。1 群 4 例のウサギをトキシコキネティクス評価に割り付けた。

高用量の 0.1 mg/kg は、妊娠ニュージーランドホワイトウサギ（1 群 5 例）に tirzepatide を 0、0.01、0.05、0.1 及び 0.5 mg/kg の用量で週 1 回（妊娠 7 及び 14 日目）皮下投与した胚・胎児発生及びトキシコキネティクスに関する予備試験（WIL-353353 試験）の結果に基づいて設定した。予備試験では、体重減少及び重度の摂餌量低下が認められたため、0.5 mg/kg 群の雌 1 例を妊娠 12 日目に安楽殺し、この群の残り 4 例の雌は妊娠 15 日目に安楽殺した。残りのすべての生存例を妊娠 29 日目に剖検した。一般状態の変化として、糞排泄減少及び小型又は粘液状の便が 0.05 mg/kg 以上の用量で認められた。おおむね用量依存的な体重増加量低下及び妊娠子宮重量を除いた体重の変化が、すべての tirzepatide 投与群で認められた。投与期間中、母動物の摂餌量はすべての tirzepatide 投与群で低下したが、妊娠 21 日目より後の摂餌量は溶媒対照群とほぼ同程度であった。剖検時に肉眼所見は認められず、帝王切開パラメータの変化、胎児体重変化及び胎児外表奇形も認められなかった。Tirzepatide の曝露量は、検討した用量範囲を通して、ほぼ用量に比例して増加した。反復投与後の蓄積は認められなかった。以上の予備試験結果より、本試験の高用量に設定した 0.1 mg/kg の用量では、妊娠ウサギの MTD を超えることなく中等度の母動物毒性（体重及び摂餌量の減少）が得られると予想された。

死亡、流産、体重減少、体重増加量低下及び／又は摂餌量低下並びに消化管障害に示される母動物毒性が、すべての用量で認められた。

Tirzepatide の薬理作用に関連する顕著な体重／摂餌量低下による二次的変化と考えられる死亡が、すべての用量で認められた。0.1 mg/kg 群の胚・胎児発生検討用の雌 2 例が、妊娠 19 及び 21 日目に死亡した。さらに、0.03 mg/kg 群の胚・胎児発生検討用の雌 1 例が、妊娠 27 日目に死亡した。これらのウサギでは、いずれも死亡前の数日間に、重度の体重低下及び摂餌量低下並びに対応する糞排泄減少が認められた。0.03 mg/kg 群のトキシコキネティクス用雌 1 例は、持続的な体重及び摂餌量の変化が認められたため、妊娠 16 日目に安楽殺した。0.01 mg/kg 群の雌 3 例が妊娠 18～22 日目に死亡し、このうち 1 例は死亡前に流産した。これら 3 例のうち 2 例では、死亡前数日間に体重減少及び／又は摂餌量低下が認められた。これらの早期死亡例では胃及び十二指腸内の病理組織学的所見が認められ、その内訳は、壊死、炎症及び穿孔であり、それに関連する肉眼所見として穿孔及び／又は白色領域が認められた。病変の因果関係は多因子性で、消化管運動性の変化、ストレス及び腸内細菌叢の変化に関連している可能性が考えられた。一般状態の変化である食欲不振、糞排泄減少及び／又は軟便は、他の動物種における tirzepatide の既知の作用である消化管運動性の変化を示していた。後腸発酵動物かつ小型草食動物であるウサギは、消化管運動性変化に伴う腸微生物叢の変化及び生理的ストレスに起因するコルチゾール濃度上昇といった有害作用への感受性が高い。ウサギにおけるストレス及び腸運動性に関する最近の研究により、

心因性ストレスに起因する胃十二指腸運動性の乱れによる胃前庭部の運動性低下及びそれに伴った十二指腸の運動性増加により、胃十二指腸逆流が誘発され、それによって本試験で認められたような胃潰瘍の形成が亢進する可能性がある（Ovsyannikov et al. 2015）。また、運動性の変化に起因する正常な腸内細菌叢の変化により、クロストリジウムのような毒素産生細菌が過剰増殖する環境が生まれる（Garcia et al. 2014）。クロストリジウム属に類似した細菌が十二指腸の内腔及び壊死部位に認められたが、培養では系統は特定されなかった。ウサギの胃には食料貯蔵庫の性質があり、げっ歯類と比較して生理的条件下での伸長性が高いため、異常な運動性及び／又は細菌の過剰増殖に起因すると考えられる潰瘍形成や胃及び十二指腸の部位での穿孔は予想外な変化ではない。0.03 及び 0.1 mg/kg 群で、別のそれぞれ 1 及び 2 例の雌が妊娠 25～28 日目に流産したが、これらは流産前の数日間に認められた体重減少及び摂餌量低下による二次的変化と考えられた。0.1 mg/kg 群の雌 1 例が、整復不能な器官脱出のため妊娠 24 日目に瀕死安楽殺に至った。剖検時に、この雌では膀胱脱出及び副脾が認められ、子宮内に 8 例の生存胎児（明らかな奇形なし）が残存していた。病理学組織学的検査で瀕死状態の原因は特定されず、tirzepatide との関連性は不明であった。胚・胎児発生検討用及びトキシコキネティクス用動物のいずれにおいても、他の雌全例が計画安楽殺時まで生存した。

0.03 及び 0.1 mg/kg 群の雌の生存例では、tirzepatide に関連した排泄物関連所見（糞排泄減少、軟便及び関連する種々の体表面上の褐色物質所見）が、溶媒対照群と比較して増加した。これらの群では、投与期間中に、摂餌量低下及び糞排泄減少が認められた。0.1 mg/kg 群では、tirzepatide の投与ごとに、tirzepatide に関連した体重低下及び摂餌量低下が認められ、0.03 mg/kg 群ではより軽度に認められた。その結果、0.1 mg/kg 群では体重低下が試験を通して認められたのに対し、0.03 mg/kg 群の体重はおおむね溶媒対照群と同程度であった。0.03 及び 0.1 mg/kg 群では妊娠子宮重量を除いた妊娠 29 日目の体重に低下が認められたが、妊娠子宮重量はおおむね溶媒対照群と同程度であった。0.01 mg/kg 群では tirzepatide に関連した摂餌量低下が投与後（妊娠 7～10、14～17 及び 17～21 日目）に認められたが、残りの試験期間中はおおむね溶媒対照群と同程度であった。0.01 mg/kg 群における体重、体重増加量、妊娠子宮重量を除いた妊娠 29 日目の体重増加量及び妊娠子宮重量には、tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

妊娠 29 日目の計画剖検時に、tirzepatide に関連した肉眼所見が 0.01 及び 0.1 mg/kg の用量で認められ、その内訳は、十二指腸内の菲薄化領域及び／又は白色領域並びに空腸、盲腸及び／又は回腸の膨満であった。0.03 mg/kg の用量では、tirzepatide に関連した肉眼所見は認められなかった。Tirzepatide に関連した病理組織学的所見が胃及び十二指腸に認められた。胃では壊死、炎症及び潰瘍形成がすべての tirzepatide 投与群で、十二指腸では壊死及び／又は潰瘍形成／穿孔が 0.01 及び 0.1 mg/kg 群で認められた。これらの所見の発現頻度及び重症度には、用量依存的な関連性は認められなかった。

Tirzepatide に関連した毒性的な胎児体重低下が、0.1 mg/kg 群において溶媒対照群と比較して認められた。0.01 及び 0.03 mg/kg の用量での子宮内発育並びにすべての用量での子宮内生存及び胎児形態には、tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

以上、すべての用量で母動物毒性が認められ、その所見は、死亡、流産、体重減少、体重増加量低下及び／又は摂餌量低下並びに胃腸障害であった。生存への影響は tirzepatide の薬理作用に関連した体重／摂餌量の低下及び消化管運動性の変化に対し、ウサギ特有の感受性による二次的

変化として胃腸病変が生じ、続いて流産及び死亡に至ったと考えられた。これらの所見に基づき、母動物毒性に関する NOAEL は設定できなかった。0.1 mg/kg の用量での胎児体重低下に基づき、tirzepatide をウサギの妊娠 7 及び 14 日目に皮下投与したときの胚・胎児発生毒性に関する NOAEL は 0.03 mg/kg であった。同用量での妊娠 7 及び 14 日目における曝露量（$AUC_{0\text{-}168hr}$）は、それぞれ 14000 及び 14700 ng•hr/mL であった。

2.6.6.6.5　ラットを用いた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

（添付資料 4.2.3.5.3.1、00353460 試験、概要表 2.6.7.14-1）

本試験（00353460 試験、概要表 2.6.7.14-1）の目的は、tirzepatide を母ラットに着床から離乳まで投与したときの妊娠維持、分娩及び授乳並びに F1 出生児の成長、生存性及び発達に対する有害作用の有無を検討することであった。F1 出生児の評価項目には、生存、成長、行動能、性成熟、性周期、生殖能（交配及び受胎能）及び精子検査が含まれていた。F1 雌の帝王切開を妊娠 15 日目に実施した。

Tirzepatide を、雌ラット（1 群 25 例）に、0、0.02、0.1 及び 0.25 mg/kg の用量（0.2 mL/kg の投与容量）で、妊娠 6、10、13、17 及び 20 日目並びに分娩後 4、7、11、14 及び 18 日目に皮下投与した。1 群 4 例のラットをトキシコキネティクス評価に割り付けた。

高用量の 0.25 mg/kg は、tirzepatide を妊娠ラットに 0、0.02、0.1 又は 0.5 mg/kg の用量で妊娠 6、10、13 及び 17 日目に皮下投与したラットの胚・胎児発生に関する試験（WIL-353354 試験）の結果に基づいて設定した。胚・胎児発生に関する試験において、母動物体重低下（対照群より 21.4%少ない）、母動物の摂餌量低下及び胎児の変化が 0.5 mg/kg の用量で認められたことから、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では、0.5 mg/kg の半量である 0.25 mg/kg を最大用量として設定した。

生存（F0 雌、F1 雌雄又は F2 胚）、妊娠期間長、分娩過程、肉眼所見（F0 雌、F1 雌雄又は F2 胚）、出生後の生存、F1 児の一般状態、発達指標到達（亀頭包皮分離及び膣開口）、驚愕性反応性、自発運動量、学習及び記憶、F1 の生殖能（交配、受胎能、交尾及び妊娠）、精子パラメータ（平均精巣上体尾部精子数、運動能及び形態）並びに F1 の病理組織学的所見には、tirzepatide に関連した変化は認められなかった。

Tirzepatide に関連した非毒性的な一般状態の変化として、蒼白便が、すべての投与群の F0 雌において、妊娠及び分娩後期間中の観察で散見された。また、一般状態の変化の削痩及び糞排泄減少が、0.1 及び 0.25 mg/kg 群の雌において観察で認められたが、これらの変化は、これらの群で認められた体重及び摂餌量の変化による二次的変化と考えられた。他には、観察で tirzepatide に関連した所見は認められなかった。

Tirzepatide に関連した体重増加量低下及び対応する摂餌量低下が、0.1 及び 0.25 mg/kg 群の F0 雌でおおむね妊娠投与期間を通して認められた。その結果、妊娠期間中のこれらの群における体重は、対照群と比較して、それぞれ最大で 4.3%及び 7.3%少なかった。0.25 mg/kg 群の体重変化は毒性変化と考えられたが、0.1 mg/kg 群の変化は程度が低かったため毒性変化ではないと考えられた。0.1 及び 0.25 mg/kg 群の雌では、対照群より少ない体重（最大でそれぞれ 6.5%及び 9.8%）が、引き続き分娩後 14 日目（0.10 mg/kg）又は 18 日目（0.25 mg/kg）まで認められたが、これらの群の体重増加量は、分娩後期間を通しておおむね対照群と同程度であった。0.1 及び 0.25 mg/kg 群

の摂餌量は、分娩後投与期間（分娩後 1～21 日目）を通して対照群より少なかった。しかしながら、これらの群では対応する体重増加量低下は認められず、分娩後 14～21 日目における体重増加量は対照群より多かった。したがって、これらの摂餌量の変化は、tirzepatide に関連した変化ではあるが毒性変化ではないと考えられた。妊娠及び分娩後期間中の 0.02 mg/kg 群における体重、体重増加量及び摂餌量には、tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

F1 児の体重及び体重増加量に tirzepatide に関連した変化が認められた。0.25 mg/kg 群における雄及び雌の F1 児の出生時体重［分娩後 1 日目（Postnatal day 1：PND 1）］は、対照群と比較して、それぞれ 9.2%及び 6.8%少なかった。F1 雌雄における対照群と比較した体重増加量低下が、0.1 及び 0.25 mg/kg 群で PND 4～10 に、0.25 mg/kg 群で PND 10～14 に、それぞれ認められた。これらの群での体重増加量低下の結果として、0.10 mg/kg 群の雄及び雌における体重が、PND 10～14 に対照群と比較してそれぞれ最大で 9.3%及び 8.0%少なく、0.25 mg/kg 群の雄及び雌における体重が、生後離乳前期間（PND 1～21）を通して、対照群と比較してそれぞれ最大で 19.2%及び 16.6%少なかった。0.25 mg/kg 群での体重変化は毒性変化と考えられたが、0.1 mg/kg 群での体重変化は程度が低く、PND 21 の体重は対照群と同程度に回復したことから、同群での変化は毒性変化ではないと考えられた。0.02 mg/kg 群の F1 児の体重及び体重増加量には F0 母動物への tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

0.25 mg/kg 群の F1 雄における体重増加量低下が離乳以降もほぼ試験全体を通して認められた。これらの雄の体重は、試験を通して対照群より 8.4%～13.0%少なかったことから、毒性変化と考えられた。0.25 mg/kg 群の雌では、体重減少（11.3%）が離乳直後（PND 21）に認められたが、その体重増加量は交配前及び妊娠期間を通して対照群と同程度であり、PND 63 までの体重は対照群と同程度であった。0.02 及び 0.10 mg/kg 群の雌雄における体重及び体重増加量には、離乳後期間を通して F0 母動物への tirzepatide 投与の影響は認められなかった。

F1 雄における用量依存的な tirzepatide に関連した器官重量の変化として、精巣上体重量減少（左右、全体及び尾部）が 0.25 mg/kg 群で、精巣重量減少（左右）が 0.1 及び 0.25 mg/kg 群で、それぞれ認められた。いずれの器官重量の変化も、関連する病理組織学所見や精子パラメータの変化（精巣上体尾部精子数、運動能及び形態）は認められず、対応する生殖能の変化（交配、受胎能、交尾及び妊娠）も認められなかったことから、毒性変化ではないと考えられた。F1 雌には tirzepatide に関連した器官重量の変化は認められなかった。

以上、0.25 mg/kg の用量での体重、体重増加量及び摂餌量の変化に基づくと、tirzepatide をラットに妊娠 6、10、13、17 及び 20 日目並びに分娩後 4、7、11、14 及び 18 日目に皮下投与したときの F0 母動物の全身毒性に関する NOAEL は 0.1 mg/kg と判断された。0.25 mg/kg 群の F1 で出生児体重及び体重増加量への影響が認められたことから、F1 新生児／発達毒性に関する NOAEL は 0.1 mg/kg と判断された。0.25 mg/kg 群の F1 雄で試験を通して体重及び体重増加量の変化が認められたことから、離乳後の F1 雄動物の全身毒性に関する NOAEL は 0.1 mg/kg と判断された。いずれの用量においても毒性変化が認められなかったことから、離乳後の F1 雌動物の全身毒性、F1 の生殖毒性及び F2 の新生児毒性に関する NOAEL は最高用量の 0.25 mg/kg と判断された。

2.6.6.6.6　幼若ラットを用いた毒性試験

（添付資料 4.2.3.5.4.2、00353469 試験、概要表 2.6.7.15-1）

本試験（00353469 試験、概要表 2.6.7.15-1）の目的は、tirzepatide を雌雄の幼若 Sprague Dawley ラットに PND 21 から PND 84 まで 3 日に 1 回（合計 22 回）皮下投与したときの成長及び発達に対する有害作用の有無を検討することであった。また、投与後期間中に神経行動及び生殖の評価を行った。

Tirzepatide を 1 群雌雄各 40 例のラットに 0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg の用量（1 mL/kg の投与容量）で皮下投与した。1 群雌雄各 10 例の主試験コホートを PND 87 に剖検し、1 群雌雄各 10 例の回復性試験コホートを PND 105 に剖検した。残りの 1 群雌雄各 20 例は、神経行動及び生殖コホートに割り付けた。生殖コホート試験のラットを、受胎能評価のため同じ系統の無処置ラットと交配させた。トキシコキネティクス評価のためのサテライト群として、1 群雌雄各 33 例を tirzepatide 群に、雌雄各 12 例を対照群に、それぞれ割り付けた。

高用量の 1.5 mg/kg は、幼若ラットに tirzepatide を 0、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg の用量で PND 21 から PND 41 まで週 2 回皮下投与した予備試験（00353459 試験）に基づいて設定した。雌雄のいずれにおいても、tirzepatide のすべての用量で、各投与後に体重増加量低下又は体重低下が認められた。成獣ラットで認められたパターンに一致して、体重増加量低下又は体重低下に続いて数日間にわたり体重増加量が増加することが多く、変化の程度が最も大きかったのは初回投与後のことが多かった。試験の第 1 週に、1.5 mg/kg 群では対照群と比較して最大で 25%の体重低下が認められた。体重への影響を考慮すると、1.5 mg/kg が幼若ラットで検討可能な最高用量と考えられたことから、同用量を本試験での高用量として設定した。

本試験の評価項目は、生存、一般状態、体重、体重変化、摂餌量、性成熟、行動評価（自発運動量、驚愕反応並びに学習及び記憶）、性周期、生殖能（交配及び受胎能）、精子検査、臨床検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

死亡は発現せず、性周期、生殖能（交配、受胎能、交尾及び妊娠）、神経行動（自発運動量、驚愕反応並びに学習及び記憶）、胎児の子宮内発育及び生存、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査及び血清生化学的検査）並びに精子パラメータにおいて、tirzepatide に関連した変化は認められなかった。

Tirzepatide に関連した体重低下及び／又は体重増加量低下並びに対応する摂餌量低下が、すべての tirzepatide 投与群の雌雄において投与期間全体（PND 21～86）で認められた。投与期間終了時（PND 86）の 0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg 群における体重は、対照群と比較して、雄でそれぞれ 8.2%、14.0%及び 20.2%少なく、雌でそれぞれ 7.1%、7.8%及び 6.7%少なかった。

休薬期間中の体重増加量増加が、すべての用量で PND 87～104 の期間におおむね雄で認められ、その後は対照群と同程度であった。その結果、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雄の体重は回復を示し、PND 146 には、0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雄の体重はそれぞれ対照群と同程度、3.9%及び 5.9%の減少まで回復した。0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雌で、投与終了直後（PND 87～88）の体重増加量が増加した。PND 87（休薬期間の初日）における 0.5 及び 1.5 mg/kg 群の体重は、対照群と比較して少なかったが、休薬開始直後に体重増加量が増加した後、残りの休薬期間を通して、体重はおおむね対照群と同程度であった。休薬期間中の摂餌量増加が、0.15 mg/kg 群の雄では PND 87～91 に、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雄では PND 87～91 及び 91～94 に、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雌では

PND 87～91 に、それぞれ認められた。体重増加量増加に対応する摂餌量増加が雌で認められた。その後の摂餌量はおおむね対照群と同程度であった。

亀頭包皮分離及び膣開口の到達遅延が、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雌雄で認められた。これは tirzepatide に関連した体重変化に起因するものであり、tirzepatide の直接作用ではないと考えられた。

病理組織学的評価で認められた、皮膚の脂肪組織萎縮の特徴は、深部真皮と平滑筋の間の皮膚における脂肪細胞の小型化及び数減少であった。この所見は 0.15、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雌雄で認められ、発現頻度及び重症度は用量依存的に増加した。この所見は皮膚の機能を損なうものではないと思われること、また他に tirzepatide に関連した皮膚所見は認められなかったことから、毒性変化ではないと考えられた。休薬期間終了時剖検では、tirzepatide を投与した動物の皮膚における脂肪組織萎縮は認められなかった。全例の注射部位についても検討したが、tirzepatide に関連した脂肪組織萎縮は認められなかった。主試験及び休薬期間終了時の剖検において、他に tirzepatide に関連した病理組織学的所見は認められなかった。

最終体重低下に起因する器官重量の変化が 0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雄で認められたが、tirzepatide 投与の直接的な結果ではないと考えられた。休薬期間終了時剖検での 1.5 mg/kg 群の雄における腎重量減少は、持続的な体重低下に起因するものであり、これ以外に 0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雄で主試験剖検時に認められた器官重量の変化は、休薬期間終了時剖検では認められなかった。

以上、0.5 及び 1.5 mg/kg 群の雄での体重の毒性変化並びに対応する器官重量減少及び摂餌量低下に基づくと、tirzepatide を幼若ラットに皮下投与したときの全身毒性に関する NOAEL は 0.15 mg/kg と考えられた。いずれの用量においても、生殖、神経行動及び発達の評価項目の毒性変化は認められなかったことから、生殖、神経行動及び発達毒性に関する NOAEL は 1.5 mg/kg と判断された。

2.6.6.7　局所刺激性試験

Tirzepatide の局所刺激性を評価するための独立した試験は実施しなかった。局所刺激性については、反復投与毒性試験、がん原性試験、幼若動物を用いた毒性試験及び生殖発生毒性試験の一環として評価した。一般状態観察並びに注射部位の肉眼観察及び病理組織学的検査に基づくと、tirzepatide は重大な局所注射部位反応を誘発しなかった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　光毒性試験

Tirzepatide の光毒性試験は実施しなかった。規制ガイドラインでは、内在性タンパク質を含むペプチド／タンパク質は、発色団として作用する可能性がある芳香族アミノ酸を含有するため、紫外線吸収（通常は 280 nm にピーク、290 nm に肩がある）を示すことがあるが、これは光安全性上の懸念には関連しないことが示されている。一般に、ペプチド／タンパク質については、光安全試験は不要とされている（EMA 2011）。

2.6.6.8.2　不純物の安全性確認試験

2.6.6.8.2.1　不純物の安全性確認試験（8394210 試験）

（添付資料 4.2.3.7.6.1、8394210 試験、概要表 2.6.7.17-1）

本試験（8394210 試験、概要表 2.6.7.17-1）の目的は、tirzepatide 製剤中の不純物（主要分解物）をラットに週 2 回、2 週間（合計 5 回）皮下投与したときの安全性を確認することであった。

雌雄のラットを 1 群雌雄各 10 例からなる 2 群に割り付けた。1 群には[redacted]%の総不純物を含有する tirzepatide（ロット[redacted]）を 3 mg/kg の用量で投与した。不純物の内訳は、[redacted]%の *不純物A 、[redacted]%の *不純物B 、[redacted]%の *不純物C 、[redacted]%の *不純物D 、[redacted]%の *不純物E 及び[redacted]%の *不純物F であった。他の 1 群には溶媒（5 mM リン酸及び 140 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0）を投与した。ラットには投与期間の 1、5、8、12 及び 15 日目に 1.5 mL/kg の投与容量で皮下投与した。

毒性の評価は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査及び病理学的検査に基づいて行った。

被験物質に関連した死亡は発現しなかった。被験物質に関連した所見は、摂餌量低下及び体重低下に伴う削痩のみであり、ラットの反復投与毒性試験において不純物を含まない tirzepatide で認められた変化に一致していた。

被験物質に関連した眼科学的所見は認められなかった。

投与期間終了時屠殺時に、被験物質に関連した臨床検査所見がいくつか認められた。これらの所見は軽微又は軽度であり、その内訳は、雌雄における平均赤血球容積（MCV）及び総タンパク濃度減少並びに ALT 及び ALP 活性の増加、雄における網状赤血球数、好中球数、赤血球分布幅（RDW）、グルコース及びトリグリセリド濃度の減少、雌における赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）及びカルシウムの減少並びに尿素窒素及びリン濃度の増加であった。ALT 及び ALP 活性の増加は軽度（対照の 2 倍未満）であり、関連する病理組織学的所見は認められなかった。これら以外の臨床検査所見は、摂餌量／体重の低下により二次的に生じた可能性が考えられた。総タンパクの減少は、雄ではグロブリン減少、雌ではアルブミン減少に起因すると考えられた。カルシウム減少は雌におけるアルブミン減少に起因した可能性がある。

被験物質に関連した肉眼所見は認められなかった。

3 mg/kg 群における被験物質に関連した器官重量パラメータの変化は、統計学的に有意な最終体重減少による二次的変化と考えられた。

3 mg/kg 群の雄及び／又は雌で認められた被験物質に関連した病理組織学的所見は、摂餌量低下、体重低下又はストレスによる二次的変化と考えられ、その内訳は、皮膚の皮下組織における軽度から中等度の脂肪細胞萎縮、膵臓における軽度のチモーゲン顆粒減少及び胸腺におけるリンパ系所見（軽微なリンパ球壊死又は軽微な皮質リンパ球減少）であった。

以上、本試験で認められたすべての所見は、tirzepatide の薬理作用及び反復投与毒性試験で見られた所見に一致していた。不純物として *不純物B 、 *不純物A 、*不純物C 、 *不純物D 、 *不純物E 及び *不純物F を含有する tirzepatide を 3 mg/kg の用量で週 2 回皮下投与したところ、新たな毒性及び毒性の悪化は認められなかった。

2.6.6.8.2.2　不純物の安全性確認試験（8420235 試験）

（添付資料 4.2.3.7.6.2、8420235 試験、概要表 2.6.7.17-1）

本試験（8420235 試験、概要表 2.6.7.17-1）の目的は、tirzepatide 製剤中の不純物をラットに週 2 回、2 週間以上（合計 5 回）皮下投与したときの安全性を確認することであった。

雌雄のラットを 1 群雌雄各 10 例からなる 3 群に割り付けた。1 群には tirzepatide のロット[redacted]（ロット A と呼ぶ）を 3 mg/kg の用量で投与し、1 群には不純物として[redacted]%の *不純物A 、[redacted]%の *不純物B 、[redacted]%の *不純物E 及び[redacted]%の *不純物F を含有する tirzepatide のロット[redacted]（ロット B と呼ぶ）を 3 mg/kg の用量で投与した。他の 1 群には溶媒（5 mM リン酸及び 140 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0）を投与した。ラットには投与期間の 1、5、8、12 及び 15 日目に 1.5 mL/kg の投与容量で皮下投与した。

毒性の評価は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査及び病理学的検査に基づいて行った。

ラットの全例が計画屠殺時まで生存した。Tirzepatide のいずれのロットにおいても、一般状態の変化として削痩及び立毛が認められ、それに伴って体重低下及び摂餌量低下が認められた。ロット A 及びロット B の投与群間で、一般状態の変化である削痩及び立毛の発現頻度に差は認められず、体重、体重低下及び摂餌量にも差は認められなかった。

被験物質に関連した器官重量の変化及び肉眼所見は認められなかった。尿検査及び血液凝固検査のパラメータにおいて、被験物質に関連した変化は認められなかった。

臨床検査において見られた被験物質に関連した変化は小規模で、ロット A 投与群とロット B 投与群の間で同程度であり、その内訳は、雌雄における赤血球量（ヘモグロビン濃度、赤血球数及びヘマトクリット）、MCV 及び絶対網状赤血球数の軽微な減少並びに／又はトリグリセリド濃度の低下であった。雌では軽微な RDW 減少及びアルブミン濃度低下並びにそれに伴う総タンパク及びカルシウム濃度の低下が認められた。これらの変化の機序は不明であったが、被験物質に関連した摂餌量／体重低下による二次的変化の可能性がある。

病理組織学的検査で見られた被験物質に関連した所見の発現頻度及び重症度はロット A 投与群とロット B 投与群の間で同程度であり、統計学的に有意な体重低下による二次的変化と考えられた。その内訳は、雌雄の皮膚切片及び注射部位皮膚における皮下組織の軽微から重度の脂肪細胞萎縮並びに雄の乳腺萎縮であった。ストレスによる二次的な所見として、胸腺に軽微から軽度のリンパ球アポトーシス発現頻度の増加が認められ、それに関連して軽微な絶対リンパ球数減少（雄）が認められた。

以上、本試験で認められたすべての変化は、tirzepatide の薬理作用及び反復投与毒性試験で見られた所見に一致していた。Tirzepatide のロット A 及びロット B をラットに 3 mg/kg の用量で週 2 回、2 週間皮下投与したところ、ロット間での差は認められなかった。したがって、不純物に関連する新たな毒性及び毒性の悪化は認められなかった。

2.6.6.8.3　不純物の評価

2.6.6.8.3.1　非遺伝毒性不純物

Tirzepatide 原薬中の不純物の毒性を、6 ヵ月間反復投与毒性試験を含む非臨床毒性試験の一環として、また合成不純物及び分解物の安全性を評価するために実施した 2 つの安全性確認試験に

おいて評価した。毒性試験で使用した tirzepatide 原薬の各ロットの不純物プロファイルは表 2.6.7.4 を、規格設定の妥当性に関する詳細は CTD 第 3.2.P.5.6 項をそれぞれ参照のこと。

Tirzepatide 中の不純物の安全性を評価するため、3 つの毒性ロットを使用した。最初の毒性ロット[redacted]の総不純物含有率は[redacted]%であった。このロットには、一部の合成不純物が高い濃度で含まれていた。それはこのロットのクロマトグラフィー精製工程を申請製造方法の 2 回ではなく、1 回のみの実施としたからである。2 番目の毒性ロット[redacted]は、熱ストレス下で形成される主要分解物を高濃度で得るために高温に曝露された。これらの分解物は、製剤保存中に増加が認められた主要分解物に一致している。3 番目の毒性ロット[redacted]は、高濃度の[redacted]及び[redacted]が添加された開発原薬バッチから調製された。ロット[redacted]及び[redacted]は、同じマトリックスの処方で製剤化された。

ラットにロット[redacted]を週 2 回皮下投与した安全性確認試験（8394210 試験）に基づくと、総不純物、*不純物C 、 *不純物D 、 *不純物E 及び *不純物F の申請規格の規格値は毒性学的に許容可能であった。これは安全性確認試験におけるこれらの不純物の曝露量が申請規格の tirzepatide 原薬を予定最高用量で投与した時の曝露量より高かったからである（表 2.6.6-2）。

*不純物A 及び *不純物B については、毒性試験における曝露量は申請規格の tirzepatide 原薬を予定最高用量で投与した時の曝露量より低かったが、安全性確認試験における所見はいずれも tirzepatide 及びその他の長時間作用型 GLP-1 受容体アゴニストの薬理作用に一致するものであったことから、 *不純物A 及び *不純物B はこれらの所見に寄与しなかったと考えられる。これらの不純物はすべての臨床ロット及び毒性ロット中に存在しており、tirzepatide の臨床試験からの利用可能な患者安全性データの詳細な評価を含めて、患者の安全性及び有効性に影響を及ぼすリスクについて、専門家による更なる評価が実施された。このリスク評価により、申請規格の規格値における *不純物A 及び *不純物B の濃度は、tirzepatide を最高用量の 15 mg で週 1 回皮下投与したときの正のベネフィット／リスク関係に負の影響を及ぼさないと結論された（CTD 第 3.2.P.5.6 項）。

表 2.6.6-2.　ラット反復投与毒性試験及び安全性確認試験並びに予定臨床最高用量から算出された総不純物及び規格設定不純物の曝露量比

	Tirzepatide の AUC (µg•hr/mL)	**曝露量比 [a]**							
		Tirzepatide	**総不純物 [b]**	*不純物A [b]	*不純物B [b]	*不純物C [b]	*不純物D [b]	*不純物E [b]	*不純物F [b]
予定臨床最高用量（15 mg）	250[c]	–	–	–	–	–	–	–	–
ラットで安全性の評価された用量（3 mg/kg）	280[d]	[redacted]	[redacted][e]	[redacted][e]	[redacted][f]	[redacted][e]	[redacted][e]	[redacted][e]	[redacted][e]

略号：$AUC_{0-\tau}$ = 1 投与間隔における血漿中濃度－時間曲線下面積、BMI = ボディマス指数、PK = 薬物動態

a　曝露量比は（動物における $AUC_{0-\tau}/\tau$）/（ヒトにおける $AUC_{0-\tau}/\tau$）として算出した。τ は、ラットでは 96 時間、ヒトでは 168 時間。したがって、ラットにおける tirzepatide の曝露量比は（280/96）/（250/168）。

b　申請規格の規格値（類縁物質/不純物の合計量が[redacted]%、*不純物A が [redacted]%、*不純物B が [redacted]%、*不純物C が [redacted]%、*不純物D が [redacted]%、*不純物E が [redacted]%及び *不純物F が [redacted]%）に基づく曝露量比。

c　母集団 PK モデルを用いた血漿中濃度推移のシミュレーションに基づいて算出した（母集団 PK 解析対象集団における 2 型糖尿病患者のベースラインの体重、BMI 及び性別を用いたシミュレーション。平均体重は 89.6 kg）（Population PKPD）。

d　6 ヵ月間反復投与毒性試験（8337876 試験）で得られた曝露量。[redacted]%の類縁物質/不純物の合計量を含有する tirzepatide（ロット[redacted]）を用いて実施した。

e　[redacted]%の類縁物質/不純物の合計量、[redacted]%の *不純物A、[redacted]%の高分子量種、[redacted]%の *不純物D、[redacted]%の *不純物E 及び [redacted]%の *不純物F を含有する tirzepatide（ロット[redacted]）について、ラットに 3 mg/kg の用量で週 2 回投与する 2 週間安全性確認試験（8394210 試験）での不純物の推定曝露量に基づき曝露量比を算出した。

f　[redacted]%の類縁物質/不純物の合計量及び[redacted]%の *不純物B を含有する tirzepatide（ロット[redacted]）について、ラットに 3 mg/kg の用量で週 2 回投与する 2 週間安全性確認試験（8420235 試験）での不純物の推定曝露量に基づき曝露量比を算出した。

2.6.6.8.3.2　遺伝毒性不純物

実生産合成経路における遺伝毒性不純物については、ICH M7 (R1) の推奨事項に準じ、完全な評価が実施されており、その詳細は CTD 第 3.2.S.3.2.5 項に記載されている。

Tirzepatide の合成経路におけるすべての出発物質、中間体、試薬及び副反応について、必要に応じ、in silico 毒性予測、警告構造を用いた評価、社外データベースを用いた評価及び in vitro 試験を適宜組合せて変異原性リスクを評価した。その結果、tirzepatide 合成の出発物質に由来する変異原性不純物は特定されなかった。すべての天然型アミノ酸（すべての保護基を含む）及び非天然型アミノ酸の 2-アミノ-2-メチルプロパン酸を含めて、変異原性リスクを有する出発物質は特定されなかった。アミノ酸出発物質中に不純物として存在する可能性がある潜在的非天然型アミノ酸について in silico 評価を実施した結果、アラートは認められなかった。リンカーを含む tirzepatide 脂肪酸側鎖にはアラートは認められず、Derek 及び Leadscope モデルはいずれも陰性であったことから、いかなる変異原性リスクも有しないクラス 5 化合物と判断された。

2.6.6.9　考察及び結論

Tirzepatide が毒性又は望ましくない変化を誘発する可能性について、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを用いた最長 6 ヵ月間の反復投与毒性試験を含む包括的な安全性評価プログラムで評価した。また、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能、雄の受胎能及び雌の受胎能に対する tirzepatide の影響の有無をラットの試験で評価し、胚・胎児発生に対する影響の有無をラット及びウサギで評価した。さらに、小児を対象とした開発をサポートするため、全般的な成長及び発達に対する tirzepatide の影響の有無を評価する目的で、幼若ラットを用いた毒性試験を実施した。心血管系、呼吸系及び中枢神経系に関連した tirzepatide の薬理作用の有無を、サルの 1 ヵ月間反復投与毒性試験で評価した。心血管系への影響についてはサルを用いた単回投与安全性薬理試験でも評価し、不整脈誘発のリスクを hERG 試験で評価した。がん原性の評価は RasH2 マウスを用いた 26 週間試験及びラットを用いた 2 年間がん原性試験で実施した。遺伝毒性の有無についてラットを用いた in vivo 小核試験で評価するとともに、ICH M7 (R1) の推奨に一致した実生産合成経路における遺伝毒性不純物に対する評価を実施した。

ラット及びサルの反復投与毒性試験並びに生殖発生毒性試験における重要な tirzepatide に関連した所見は、概して、インクレチンの薬理作用に一致するか又はそれによる二次的変化であり、その内訳は体重増加量低下及び／又は体重低下並びに摂餌量低下であった。ラット及びサルのいずれにおいても、直接的な標的器官毒性は認められず、サル 1 ヵ月間反復投与毒性試験における安全性薬理評価では、中枢神経系及び呼吸系に対する安全性上の懸念は特定されなかった。サルの心血管系に対する影響は GLP-1 受容体アゴニストの薬理作用に一致していた。これらの変化には、tirzepatide 単回皮下投与後の心拍数増加、血圧上昇及び心収縮性低下が含まれていた。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。サルを用いた単回及び反復投与毒性試験において、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 hERG 電流阻害作用を示さなかったことから、予想される不整脈誘発リスクは低いことが確認された。

ラットを用いた雌の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では、黄体数が減少した結果、着床数及び生存胚数が減少し、性周期も障害された。これらの変化は、tirzepatide のすべて

の用量で認められた体重及び摂餌量の低下による二次的変化と考えられた。交尾率、受胎率、交尾所要日数及び着床胚損失率には変化が認められなかった。発生への影響（ラット及びウサギでの胎児体重低下、出生児体重低下並びにラットでの奇形及び変異の増加）は、母動物毒性（体重減少）が見られた用量でのみ発現した。雄の受胎能に関する試験において、精子、生殖能、雄性生殖器及び初期胚生存には変化が認められなかった。

Tirzepatide はラット骨髄の多染性赤血球において小核を誘導しなかった。検討した高用量の 3 mg/kg は、用量設定予備試験において、著しい体重低下並びに一般状態の変化である立毛及び 1 日を通した活動性低下に基づいて決定された MTD であった。

がん原性試験における腫瘍性変化はラットにおける甲状腺 C 細胞のみで認められ、長時間作用型 GLP-1 受容体アゴニストについて甲状腺で報告された所見（Bjerre Knudsen et al. 2010; Byrd et al. 2015）に一致していた。その他の腫瘍性所見は認められなかった。

長期反復投与毒性試験における NOAEL は検討した最高用量であり、これらの用量での曝露量は、予定最高臨床用量 15 mg/週でのヒト曝露量とほぼ同程度又はそれをわずかに上回った（表 2.4-1）。ラット及びサルにおける変化は、いずれもインクレチンの薬理作用及び長時間作用型 GLP-1 受容体アゴニストで報告された変化に一致するか又はそれによる二次的変化であった。以上、非臨床試験から得られた所見全般から、tirzepatide を 2 型糖尿病の治療選択肢として使用することが支持されると考える。

2.6.6.10　図表

図及び／又は表は該当する項に記載した。

2.6.6.11　参考文献

Bjerre Knudsen L, Madsen LW, Andersen S, Almholt K, de Boer AS, Drucker DJ, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation. *Endocrinology.* 2010;151(4):1473-1486.

Brändli-Baiocco A, Balme E, Bruder M, Chandra S, Hellmann J, Hoenerhoff MJ, et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Endocrine System. *J Toxicol Pathol*. 2018;31(3 Suppl):1S-95S.

Byrd RA, Sorden SD, Ryan T, Pienkowski T, LaRock R, Quander R, et al. Chronic toxicity and carcinogenicity studies of the long-acting GLP-1 receptor agonist dulaglutide in rodents. *Endocrinology.* 2015;156(7):2417-2428.

Chatelain D, Montel V, Dickes-Coopman A, Chatelain A, Deloof S. Trophic and steroidogenic effects of water deprivation on the adrenal gland of the adult female rat. *Reg Peptides.* 2003:11:249-255.

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.

[EMA] European Medicines Agency. Questions and answers on the ‘Note for guidance of photosafety testing.’ 2011.

Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Toxicol Pathol*. 2013;41(4):560-614.

Garcia JP, Moore J, Loukopoulos P, Diab SS, Uzal FA. Necrotizing gastritis associated with Clostridium septicum in a rabbit. *J Vet Diagn Invest*. 2014;26(5):669-673.

Heidel SM, Page TJ. Current practices in the preclinical safety assessment of peptides. In: Shayne C Gad, editor. Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing. John Wiley & Sons, Inc; 2010.

Kemi M, Keenan KP, McCoy C, Hoe CM, Soper KA, Ballam GC, et al. The relative protective effects of moderate dietary restriction versus dietary modification on spontaneous cardiomyopathy in male

Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol*. 2000;28(2):285-296.
Kitagawa T, Ono K. Ultrastructure of pancreatic exocrine cells of the rat during starvation. *Histology and Histopathology*. 1986;1(1):49-57.
Longnecker DS. Nutritional requirements of the pancreas. In: Pour PM, editor. *Toxicology of the pancreas. Boca Raton (FL)*: CRC Press, Taylor and Francis Group. 2005. p 191-205.
Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the gastrointestinal tract, pancreas and salivary glands of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol.* 2016;29(1):71S.
Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G,et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000;32:56-67.
Ovsyannikov VI, Berezina TP, Shemerovskii KA. Mechanisms of discoordination of contractile activity in the gastroduodenal zone during psychogenic stress in rabbits. *Bull Exp Biol Med.* 2015;159(4):446-449.
Rossi MC, Nicolucci A. Liraglutide in type 2 diabetes: From pharmacological development to clinical practice. *Acta Biomedica*. 2009;80(2):93-101.
Storer RD, Sistare FD, Reddy MV, DeGeorge JJ. An industry perspective on the utility of short-term carcinogenicity testing in transgenic mice in pharmaceutical development. *Toxicol Pathol*. 2010;38:51-61.
Takaoka M, Sehata S, Maejima T, Imai T, Torii M, Satoh H, et al. Interlaboratory comparison of short-term carcinogenicity studies using CB6F1-rasH2 transgenic mice. *Toxicol Pathol*. 2003;31:191-199.
Tamaki C, Nagayama T, Hashiba M, Fujiyoshi M, Hizue M, Kodaira H, et al. Potentials and limitations of nonclinical safety assessment for predicting clinical adverse drug reactions: correlation analysis of 142 approved drugs in Japan. *J Toxicol Sci*. 2013;38:581-598.
Terry KK, Chatman LA, Foley GL, Kadyszewski E, Fleeman TL, Hurtt ME, et al. Effects of feed restriction on fertility in female rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2005 Oct; 74(5):431-441.
Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol*. 2010;38(7 Suppl):5S-81S.
Thybaud V, Kasper P, Sobol Z, Elhajouji A, Fellows M, Guerard M, et al. Genotoxicity assessment of peptide/protein-related biotherapeutics: points to consider before testing. *Mutagenesis.* 2016;31:375-384.

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

2.6.7　毒性試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.7 Toxicology Tabulated Summary 1
2.6.7.1 Toxicology: Overview 1
2.6.7.2 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies 4
2.6.7.3 Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 5
2.6.7.4 Toxicology: Drug Substance (Used in Pivotal Studies) 7
2.6.7.5 Single-Dose Toxicity 8
2.6.7.6 Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies 8
2.6.7.7 Repeat-Dose Toxicity 9
2.6.7.8 Genotoxicity: In Vitro 28
2.6.7.9 Genotoxicity: In Vivo 29
2.6.7.10 Carcinogenicity 30
2.6.7.11 Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies 39
2.6.7.12 Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development 40
2.6.7.13 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development 45
2.6.7.14 Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development 55
2.6.7.15 Studies in Juvenile Animals 61
2.6.7.16 Local Tolerance 68
2.6.7.17 Other Toxicity Studies 68

2.6.7. Toxicology Tabulated Summary

2.6.7.1. Toxicology: Overview

Type of Study	Species, Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP	Testing Facility	Document ID (Section #)
Single-Dose Toxicity							
Not applicable							
Repeat-Dose Toxicity							
	Mouse, RasH2	SC	4 weeks	0, 1, 3, 30	Yes	[redacted], USA	8376621 (4.2.3.2.1)
	Rat, Sprague Dawley	SC	1 month	0, 0.15, 0.5, 1.5	Yes	[redacted], USA	8325822 (4.2.3.2.2)
	Rat, Sprague Dawley	SC	6 months + 4-month recovery	0, 0.5, 1.5, 3	Yes	[redacted], USA	8337876 (4.2.3.2.3)
	Monkey, cynomolgus	SC	1 month	0, 0.05, 0.15, 0.5	Yes	[redacted], USA	8325823 (4.2.3.2.4)
	Monkey, cynomolgus	SC	6 months + 4-month recovery	0, 0.05, 0.15, 0.5	Yes	[redacted], USA	8336517 (4.2.3.2.5)
Genotoxicity, In Vitro							
Not applicable							
Genotoxicity, In Vivo							
In vivo micronucleus	Rat, Sprague Dawley	SC	Single dose	0, 0.75, 1.5, 3	Yes	[redacted], England	8395235 (4.2.3.3.2.1)
Carcinogenicity							
	Mouse, RasH2	SC	26 weeks	0, 1, 3, 10	Yes	[redacted], USA	8392063 (4.2.3.4.2.1)
	Rat, Sprague Dawley	SC	2 years	0, 0.15, 0.5, 1.5	Yes	[redacted], USA	8392734 (4.2.3.4.1.1)

(continued)

2.6.7.1. Toxicology: Overview (Continued)

Type of Study	Species, Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP	Testing Facility	Document ID
Reproductive and Developmental Toxicity							
Fertility, male	Rat, Sprague Dawley	SC	Twice weekly, 4 weeks prior to mating until euthanasia (total of 19 doses)	0.5, 1.5, or 3	Yes	[redacted], USA	00353430 (4.2.3.5.1.1)
Fertility and early embryonic development	Rat, Sprague Dawley	SC	Twice weekly for 2 weeks prior to cohabitation and during the cohabitation period until mating was confirmed, and through GD 6	0.5, 1.5, or 3	Yes	[redacted], USA	WIL-353356 (4.2.3.5.1.2)
Embryo-fetal development	Rat, Sprague Dawley	SC	GD 6, 10, 13, and 17	0.1, 0.5, 1.5, 3	No	[redacted], USA	WIL-353352 (4.2.3.5.2.1)
Embryo-fetal development	Rat, Sprague Dawley	SC	GD 6, 10, 13, and 17	0.02, 0.1, 0.5	Yes	[redacted], USA	WIL-353354 (4.2.3.5.2.2)
Embryo-fetal development	Rabbit, NZW	SC	GD 7 and 14	0.01, 0.05, 0.1, 0.5	No	[redacted], USA	WIL-353353 (4.2.3.5.2.3)
Embryo-fetal development	Rabbit, NZW	SC	GD 7 and 14	0.01, 0.03 or 0.1	Yes	[redacted], USA	WIL-353355 (4.2.3.5.2.4)
Pre- and postnatal development	Rat, Sprague Dawley	SC	GD 6, 10, 13, 17, and 20; LD 4, 7, 11, 14, and 18	0.02, 0.1 or 0.25	Yes	[redacted], USA	00353460 (4.2.3.5.3.1)
Juvenile	Rat, Sprague Dawley	SC	Every 4 days from PND 21-41	0.15, 0.5, 1.5	No	[redacted], USA	00353459 (4.2.3.5.4.1)
Juvenile	Rat, Sprague Dawley	SC	Every 3 days from PND 21-84	0.15, 0.5, 1.5	Yes	[redacted], USA	00353469 (4.2.3.5.4.2)
Local Tolerance							
Not applicable							
Dependence							
Not applicable							

(continued)

2.6.7.1. Toxicology: Overview (Concluded)

Type of Study	Species, Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	GLP	Testing Facility	Document ID
Other Toxicity Studies							
Impurity qualification	Rat, Sprague Dawley	SC	2 weeks	3	Yes	[redacted], USA	8394210 (4.2.3.7.6.1)
Impurity qualification	Rat, Sprague Dawley	SC	2 weeks	3	Yes	[redacted], USA	8420235 (4.2.3.7.6.2)

Abbreviations: GD = gestation day; LD = lactation day; NZW = New Zealand white; PND = postnatal day; SC = subcutaneous.

2.6.7.2. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Type of Study	Species	Route	Doses (mg/kg)	GLP	Document ID
Repeat dose, 4 week	Mouse	SC	1, 3, or 30	Yes	8376621
Repeat dose, 1-month	Rat	SC	0.15, 0.5, or 1.5	Yes	8325822
Repeat dose, 6-month	Rat	SC	0.5, 1.5, or 3	Yes	8337876
Repeat dose, 1-month	Monkey	SC	0.05, 0.15 or 0.5	Yes	8325823
Repeat dose, 6-month	Monkey	SC	0.05, 0.15 or 0.5	Yes	8336517
Carcinogenicity, 26 week	Mouse	SC	1, 3, or 10	Yes	8392063
Carcinogenicity, 104 week	Rat	SC	0.15, 0.5, or 1.5	Yes	8392734
Fertility Male	Rat	SC	0.5, 1.5, or 3	Yes	00353430
Fertility and early embryonic development	Rat	SC	0.5, 1.5, or 3	Yes	WIL-353356
Embryo-fetal development	Rat	SC	0.02, 0.1 or 0.5	Yes	WIL-353354
Embryo-fetal development	Rabbit	SC	0.01, 0.03 or 0.1	Yes	WIL-353355
Pre- and postnatal development	Rat	SC	0.02, 0.1 or 0.25	Yes	00353460
Juvenile	Rat	SC	0.15, 0.5, or 1.5	Yes	00353469

Abbreviations: SC = subcutaneous.

2.6.7.3. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data

	Steady State C_{max} (ng/mL)and AUC (ng •hr/mL)													
	Mice				Rats				Monkeys				Rabbits	
Dose	C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}	AUC
(mg/kg)	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	F	F
0.01													46.6[a]	3560[a]
0.02						52.2[b]		821[b]						
0.03													159[a]	14700[a]
0.05									389[c]	438[c]	34000[c]	34100[c]		
0.05									459[d]	468[d]	27600[d]	39000[d]		
0.1						174[b]		4010[b]						
0.1													567[a]	56400[a]
0.15									1340[c]	1210[c]	121000[c]	102000[c]		
0.15					419[e]	412[e]	7740[e]	11300[e]						
0.15					446[f]	501[f]	12900[f]	15200[f]						
0.15					341[l]	398[l]	16600[l]	18600[l]						
0.15									1210[d]	1510[d]	105000[d]	124000[d]		
0.5					1040[g]	1310[g]	45600[g]	62300[g]						
0.5									4190[c]	4580[c]	342000[c]	331000[c]		
0.5					1370[h]		42800[h]							
0.5						1380[i]		41900[i]						
0.5						1480[b]		35800[b]						
0.5					1740[e]	1580[e]	48500[e]	46000[e]						
0.5					1370[f]	1590[f]	41200[f]	49700[f]						
0.5					1050[l]	1140[l]	49200[l]	53300[l]						
0.5									5230[d]	4600[d]	427000[d]	421000[d]		
1	5400[j]	6290[j]	164000[j]	179000[j]										
1	5270[k]	5660[k]	166000[k]	171000[k]										

(continued)

2.6.7.3. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data (Concluded)

	Steady State C_{max} (ng/mL)and AUC (ng•hr/mL)													
	Mice				Rats				Monkeys				Rabbits	
Dose	C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}		AUC		C_{max}	AUC
(mg/kg)	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	F	F
1.5					3320[g]	3950[g]	128000[g]	156000[g]						
1.5					4730[h]		145000[h]							
1.5						4560[i]		129000[i]						
1.5					5130[e]	5330[e]	145000[e]	133000[e]						
1.5					4290[f]	5220[f]	124000[f]	143000[f]						
1.5					3060[l]	3370[l]	130000[l]	159000[l]						
3	16100[j]	23500[j]	476000[j]	510000[j]										
3	15500[k]	18500[k]	484000[k]	498000[k]										
3					5580[g]	6980[g]	257000[g]	302000[g]						
3					9110[h]		241000[h]							
3						9340[i]		269000[i]						
10	45700[k]	53100[k]	1520000[k]	1530000[k]										
30	217000[j]	252000[j]	4860000[j]	5470000[j]										

Abbreviations: AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximal observed plasma concentration; F = female; GD = gestation day; M = male; PND = postnatal day.

[a] C_{max} and $AUC_{0\text{-}168}$ on GD 14 (WIL-353355).
[b] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ on GD 17 (WIL-353354).
[c] C_{max} and $AUC_{0\text{-}168}$ on Day 176 (8336517).
[d] C_{max} and $AUC_{0\text{-}168}$ on Day 29 (8325823).
[e] C_{max} and $AUC_{0\text{-}last}$ on PND 84 (00353469).
[f] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96}$ on Day 29 (8325822).
[g] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96}$ on Day 176 (8337876).
[h] C_{max} and $AUC_{0\text{-}72}$ on Day 28 (00353430).
[i] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96}$ on GD 6 (WIL-353356).
[j] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96}$ on Day 26 (8376621).
[k] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96}$ on Day 176 (8392063).
[l] C_{max} and $AUC_{0\text{-}96}$ on Day 358 (8392734).

2.6.7.4. Toxicology: Drug Substance (Used in Pivotal Studies)

Lot Number	Purity (%)	Specified Impurities (%)							Document ID	Type of Study
		total impurities	*不純物A	*不純物B	*不純物C	*不純物D	*不純物E	*不純物F		
NDS Specification:	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8325822	Repeat dose, 1 month, rat
									8325823	Repeat dose, 1 month, monkey
									8337876	Repeat dose, 6 months, rat
									8336517	Repeat dose, 6 months, monkey
									WIL-353354	Embryo-fetal development, rat
									WIL-353355	Embryo-fetal development, rabbit
									WIL-353356	Fertility and early embryonic development, rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8395235	In vivo micronucleus, rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8376621	Repeat dose, 4 weeks, mouse
									00353430	Fertility, rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8392734	Carcinogenicity, 2 years, rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8392063	Carcinogenicity, 26 weeks, mouse
									00353460	Pre- and postnatal development, rat
									00353469	Juvenile, rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8394210	Impurity qualification, 2 weeks, rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	8420235	Impurity qualification, 2 weeks, rat
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		

Abbreviations: NDS = new drug substance; *不純物C

a *不純物D , *不純物E , *不純物F ,*不純物A, and *不純物B were not specified impurities at the time of manufacture or testing of these batches.

b *不純物C was not tested for development batch [redacted] but was tested for RS1058 for which batch [redacted] was the source batch.

c *不純物D is not a specified impurity for drug substance and thus not reported for drug substance batches [redacted] and [redacted].

d Results for *不純物D , *不純物E , *不純物F ,*不純物A, and *不純物B were not reported as specified impurities for batch [redacted].

e *不純物C was not tested for toxicology batches [redacted] and [redacted].

2.6.7.5. Single-Dose Toxicity

Not applicable.

2.6.7.6. Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

Not applicable.

2.6.7.7. Repeat-Dose Toxicity

Table 2.6.7.7–1. 4-Week Study in Mice

Report Title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in 001178-W (Wild Type) RasH2 Mice Administered LY3298176 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 4 Weeks

Test Article: Tirzepatide

Species/Strain: mice / RasH2 (001178-W [wild type], CByB6F1-Tg[HRAS]2Jic)

Duration of Dosing: 4 weeks

Document ID: 8376621

Initial Age: 7 weeks

Date of First Dose: [redacted]20[redacted]

Method of Administration: Subcutaneous injection

Special Features: None

Vehicle Control Article: 10 mM Tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2

GLP Compliance: Yes

No Observed Adverse Effect Level: 30 mg/kg

Mean Toxicokinetics

Sample: Plasma | Analyte: Tirzepatide | Number of animals: 3/sex/group/time point

Feeding condition: Fed | Dose frequency: Twice weekly | Assay/Method: LC-MS/MS/170034VKM_EII_R1

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	1 (Low)	3 (Mid)	30 (High)	0 (Control)	1 (Low)	3 (Mid)	30 (High)
Number of Toxicity Animals at Study Start	10	10	10	10	10	10	10	10
Dosing Phase								
Toxicokinetics:								
Day 1								
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	122000	320000	3580000	NR	90900	323000	3230000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	34500	10300	82000	NR	9690	16200	151000
C_{max} (ng/mL)	NR	4100	12200	140000	NR	2940	11500	131000
SD C_{max} (ng/mL)	NR	202	416	17400	NR	1310	4000	37200
T_{max} (hr)	NR	12.0	12.0	4.00	NR	12.0	4.00	4.00
Day 26								
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	164000	476000	4860000	NR	179000	510000	5470000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	4920	15900	184000	NR	4430	14300	115000
C_{max} (ng/mL)	NR	5400	16100	217000	NR	6290	23500	252000
SD C_{max} (ng/mL)	NR	512	361	27400	NR	646	289	NA
T_{max} (hr)	NR	4.00	4.00	4.00	NR	4.00	4.00	4.00

(continued)

Table 2.6.7.7–1.　4-Week Study in Mice (Continued)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3	30	0 (Control)	1	3	30
Number of Toxicity Animals at Study Start	10	10	10	10	10	10	10	10
Dosing Phase								
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund[a]	0	0	0	0	0	0	0	1
Clinical Observations								
Appearance, thin	0	1	0	0	0	3	0	4
Ophthalmic Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Body Weight (%)[b]								
Day 1	25.9 g	↓1.2	↓0.8	↓1.2	20.0 g	↓0.5	↓1.0	↑1.0
Day 5	27.4 g	↓9.5*	↓16.8*	↓22.6*	20.6 g	↓5.8*	↓12.1*	↓23.3*
Day 8	28.0 g	↓17.5*	↓19.3*	↓20.7*	21.3 g	↓17.8*	↓19.2*	↓19.7*
Day 12	28.5 g	↓12.6*	↓17.9*	↓18.6*	22.0 g	↓12.3*	↓16.8*	↓17.7*
Day 15	28.9 g	↓18.7*	↓23.2*	↓21.5*	22.3 g	↓22.9*	↓19.3*	↓20.6*
Day 19	29.4 g	↓13.9*	↓19.0*	↓20.4*	22.8 g	↓17.5*	↓15.4*	↓20.6*
Day 22	30.0 g	↓19.7*	↓23.3*	↓21.3*	23.2 g	↓25.0*	↓24.1*	↓20.7*
Day 26	30.4 g	↓17.4*	↓21.1*	↓22.4*	23.7 g	↓19.4*	↓16.5*	↓22.4*
Day 29	30.9 g	↓22.7*	↓25.9*	↓23.6*	23.7 g	↓20.7*	↓19.0*	↓19.0*
Food Consumption[c]	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology								
Day 30								
Red blood cell count (E6/μL)	–	–	–	–	10.22	8.95*	9.16*	8.87*
Hemoglobin concentration (g/dL)	–	–	–	–	15.6	13.4*	13.7*	13.2*
Hematocrit (%)	–	–	–	–	55.7	48.9*	50.1*	47.4*
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	–	–	–	–	15.2	14.9*	15.0*	14.9*
Clinical Chemistry								
Day 30								
Glucose concentration (mg/dL)	315	150*	223*	186*	–	–	–	–
Urea nitrogen concentration (mg/dL)	14	20*	20*	19*	–	–	–	–
Albumin concentration (g/dL)	3.2	3.3	3.4*	3.4*	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.7–1.　4-Week Study in Mice (Continued)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3	30	0 (Control)	1	3	30
Number of Toxicity Animals at Study Start	10	10	10	10	10	10	10	10
Organ Weights								
Liver/Gallbladder								
Absolute Organ Weight (%)[b]	1.5339 g	-26.8*	-33.8*	-34.6*	1.1524 g	-15.7	-12.5	-17.7*
Organ to Body Weight (%)	5.2019	4.6241	4.4311*	4.3472*	5.0921	5.0280	5.0987	4.9223
Organ to Brain Weight (%)	315.9405	239.8331*	216.4235*	214.8961*	234.2212	209.8216	217.1959	201.2712
Macroscopic Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
Number of Animals Examined	10	10	10	10	10	10	10	9
Liver								
Glycogen, decreased, hepatocytes								
Minimal	2	3	1	5	–	–	–	–
Slight	0	2	4	4	–	–	–	–
Pancreas								
Zymogen granules, decreased								
Minimal	0	0	3	6	–	–	–	–
Ovary								
Corpora lutea, decreased								
Moderate	NA	NA	NA	NA	0	3	0	0
Marked	NA	NA	NA	NA	0	7	9	9
Uterus								
Atrophy								
Slight	NA	NA	NA	NA	0	3	3	4
Cervix								
Atrophy								
Slight	NA	NA	NA	NA	0	3	3	4
Vagina								
Atrophy, epithelial								
Slight	NA	NA	NA	NA	0	3	2	1
Moderate	NA	NA	NA	NA	0	2	2	4

(continued)

Table 2.6.7.7–1.　4-Week Study in Mice (Concluded)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	1	3	30	0 (Control)	1	3	30
Number of Toxicity Animals at Study Start	10	10	10	10	10	10	10	10
Adrenal gland, cortex								
Degeneration, vacuolar, x-zone[d]								
Minimal	–	–	–	–	6	4	7	2
Slight	–	–	–	–	3	0	0	0
Moderate	–	–	–	–	1	0	0	0
Regression, x-zone[d]								
Slight	–	–	–	–	6	0	1	0
Moderate	–	–	–	–	3	0	0	0
Marked	–	–	–	–	0	10	9	9
Mandibular Salivary Gland								
Secretory depletion, granular duct								
Minimal	–	–	–	–	0	5	6	2
Slight	–	–	–	–	0	0	2	7

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under concentration-time curve from time 0 to 96 hours postdose; C_{max} = maximum observed drug concentration; GLP = Good Laboratory Practices; NA = not applicable; NR = not reported; SD = standard deviation; SEM = standard error of the mean; T_{max} = time to maximum concentration.

* = Statistically significant based on actual data (not on percent difference); $p \leq 0.05$.

[a] One toxicity female was found dead on Day 7 and the cause of death could not be determined based on pathology evaluation, although the death was not considered test-article related. One TK female was sacrificed in a moribund condition on Day 2 of the dosing phase due to the limited use of its hind legs, and one toxicokinetic male was found dead on Day 4 of the dosing phase. The cause of death for these toxicokinetic animals was not determined because necropsies were not required.

[b] For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

[c] It was not possible to determine tirzepatide effects on food consumption due to the disparate rates of DietGel and pellet consumption by controls, compared with mice administered tirzepatide.

[d] The adrenal cortex was evaluated, but the x-zone was not present in males.

Table 2.6.7.7–2. 1-Month Study in Rats

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats Given LY3298176 by Subcutaneous Injection Twice Weekly for 1 Month

Species/strain: Crl:CD (SD) Rats
Initial age: 10 weeks
Date of first dose: [redacted]20[redacted]
NOAEL: 1.5 mg/kg

Duration of dosing: 1 month
Duration of reversibility: NA
Route: Subcutaneous injection
Vehicle: 10 mM tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2

Document ID: 8325822
GLP compliance: Yes
Test Article: Tirzepatide

Special features: Active Drug Assessment

Composite Toxicokinetics

Sample: Plasma
Analyte: Tirzepatide
Number of animals: 3/sex/group/time point
Feeding condition: Fed
Dose frequency: Twice weekly
Assay/Method: LC-MS/MS / 140498VKM_EII_R1
Drug Activity: Cell-based assay: [redacted]-14-061-255 and [redacted]-14-061-251

Dose (mg/kg):	0.15		0.5		1.5	
Sex	M	F	M	F	M	F
Day 1						
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	14500	14300	46900	43000	130000	108000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	744	876	1530	3460	4160	9190
C_{max} (ng/mL)	568	534	1390	1380	4880	4080
SD C_{max} (ng/mL)	62.4	131	160	355	331	980
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Day 29						
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	12900	15200	41200	49700	124000	143000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	761	703	2340	2090	7920	5080
C_{max} (ng/mL)	446	501	1370	1590	4290	5220
SD C_{max} (ng/mL)	99.9	80.6	86.6	137	1030	514
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Drug activity[a]	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

(continued)

Table 2.6.7.7–2.　1-Month Study in Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.15		0.5		1.5	
Sex:Number of Animals	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10
Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical signs	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Body weight, g, Day 32 (% change[c])	460	291	↓7.2*	↓5.9	↓14.8*	↓8.0*	↓11.6*	↓11.4*
Body weight change, g, Day 1-32 (% change[c])	122	60	↓27.0*	↓33.3*	↓56.6*	↓41.7*	↓44.3*	↓58.3*
Food consumption, cumulative average/day (% change[c])	26	19	↓7.7	↓15.8*	↓23.1*	↓15.8*	↓19.2*	↓21.1*
Hematology								
Hematocrit (%)	–	50.3	–	47.7*	–	47.2*	–	47.1*
Hemoglobin (g/dL)	–	16.2	–	15.4*	–	15.3*	–	15.2*
Red blood cell count (E6/µL)	–	8.82	–	8.49	–	8.39*	–	8.50
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical chemistry								
Total Protein (g/dL)	6.8	7.5	6.4*	–	6.2*	6.9*	6.3*	6.9*
Albumin Concentrations (g/dL)	4.5	5.4	4.3*	–	4.2*	4.9*	4.4	4.8*
Globulin Concentration (g/dL)	2.2	–	2.1	–	2.0	–	2.0	–
Alkaline Phosphatase (U/L)	97	63	124*	–	111	81	130*	92*
Urinalysis								
Urine volume (mL)	13.2	–	20.4	–	11.5	–	27.0*	–
Urine specific gravity	1.026	–	1.017	–	>1.028	–	1.012	–
Gross pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weights								
Terminal Body Weight[b,c]	428g	266g	↓9.6*	↓8.3*	↓16.4*	↓10.5*	↓13.3*	↓14.3*
Histopathology	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.7–2.　1-Month Study in Rats (Concluded)

Abbreviations: ↓ = decrease; – = no important findings; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; NOAEL = no-observed-adverse effect level; SD = standard deviation; SEM = standard error of the mean; T_{max} = time to maximum concentration.

a Number of animals with active tirzepatide detected at end of test article administration on Day 29/total number of animals.

b Decreases in organ weights effecting the liver, kidney, brain, spleen, epididymis, uterus, and heart, were considered secondary to decreases in terminal body weight.

c 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≤.05 (Dunnett's test).

Table 2.6.7.7–3. 6-Month Study in Rats with a 4-Month Recovery Phase

Report Title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Rats Given LY3298176 by Subcutaneous Injection Twice Weekly for 6 Months with a 4-Month Recovery Phase

Test Article: Tirzepatide

Species/Strain: Crl:CD (SD) Rats
Initial Age: 7 weeks
Date of First Dose: [redacted]20[redacted]

Duration of Dosing: 6 Months
Duration of Recovery: 4 Months
Method of Administration: Subcutaneous injection
Vehicle Control Article: 10 mM tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2

Document ID: 8337876

GLP Compliance: Yes

Special Features: Drug activity
No Observed Adverse Effect Level: 3 mg/kg

Composite Toxicokinetics								
Sample: Plasma	Analyte: Tirzepatide		Number of animals: 3/sex/group/time point					
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Twice weekly		Assay/Method: LC-MS/MS/140498VKM_EII_R1 Drug Activity: Cell-based assay: [redacted]-14-061-255 and [redacted]-14-061-251					
Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	3	0 (Control)	0.5	1.5	3
Number of Toxicity Animals at Study Start	20	15	15	20	20	15	15	20
Dosing Phase								
Day 1								
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	44400	113000	279000	NR	33800	92600	173000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	1790	8680	17000	NR	1140	4450	10000
C_{max} (ng/mL)	NR	1130	3610	13800	NR	1020	3040	5470
SD C_{max} (ng/mL)	NR	65.1	625	4000	NR	59.7	721	839
T_{max} (hr)	NR	12.0	12.0	4.00	NR	12.0	12.0	12.0
Day 176								
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	45600	128000	257000	NR	62300	156000	302000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	NR	2670	7030	11000	NR	2870	7270	12500
C_{max} (ng/mL)	NR	1040	3320	5580	NR	1310	3950	6980
SD C_{max} (ng/mL)	NR	89.5	605	1290	NR	45.1	749	352
T_{max} (hr)	NR	12.0	12.0	12.0	NR	24.0	12.0	12.0
Drug activity[a]	NR	3/3	3/3	3/3	NR	3/3	3/3	3/3

(continued)

Table 2.6.7.7–3. 6-Month Study in Rats with a 4-Month Recovery Phase (Continued)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	3	0 (Control)	0.5	1.5	3
Number of Toxicity Animals at Study Start	20	15	15	20	20	15	15	20
Dosing Phase								
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund[b]	0	0	1	1	0	0	0	0
Clinical Observations								
Appearance, hunched	0	0	0	2	0	0	0	7
Body Weight (%)[c]								
Day 1	243 g	↑1.2	↓0.8	↓1.6	162 g	↑2.5	0.0	↑1.2
Day 180	637 g	↓20.6*	↓23.7*	↓29.5*	319 g	↓20.4*	↓23.8*	↓23.8*
Food Consumption (%)[c]								
Day 1-8	29 g	↓27.6*	↓51.7*	↓55.2*	20 g	↓20.0*	↓40.0*	↓45.0*
Day 8-15	28 g	↓10.7*	↓17.9*	↓14.3*	20 g	↓5.0	↓10.0*	↓15.0*
Day 15-22	28 g	↓10.7	↓14.3*	↓10.7*	21 g	↓9.5	↓14.3*	↓14.3*
Day 22-29	28 g	↓10.7	↓14.3*	↓14.3*	21 g	↓9.5*	↓19.0*	↓19.0*
Day 29-36	28 g	↓21.4*	↓14.3*	↓14.3*	21 g	↓9.5	↓19.0*	↓19.0*
Day 36-43	28 g	↓10.7*	↓14.3*	↓14.3*	23 g	↓21.7	↓26.1*	↓26.1*
Day 43-50	29 g	↓13.8*	↓13.8*	↓13.8*	21 g	↓14.3*	↓19.0*	↓19.0*
Day 50-57	29 g	↓13.8*	↓13.8*	↓17.2*	21 g	↓14.3*	↓19.0*	↓19.0*
Day 57-64	28 g	↓7.1	↓10.7	↓10.7*	20 g	↓10.0*	↓15.0*	↓15.0*
Day 64-71	29 g	↓17.2*	↓17.2*	↓24.1*	20 g	↓20.0*	↓20.0*	↓25.0*
Day 71-78	30 g	↓13.3	↓16.7*	↓23.3*	20 g	↓10.0	↓20.0*	↓20.0*
Day 78-85	28 g	↓14.3*	↓17.9*	↓25.0*	19 g	↓10.5*	↓21.1*	↓26.3*
Day 85-92	29 g	↓13.8*	↓10.3	↓17.2*	20 g	↓10.0	↓15.0*	↓20.0*
Day 92-99	29 g	↓13.8*	↓17.2*	↓20.7*	19 g	↓10.5*	↓15.8*	↓21.1*
Day 99-106	29 g	↓6.9	↓6.9	↓17.2*	20 g	↓10.0	↓10.0	↓15.0
Day 106-113	28 g	↓10.7	↓14.3*	↓21.4*	19 g	↓10.5*	↓15.8*	↓21.1*
Day 113-120	28 g	↓10.7*	↓7.1	↓14.3*	19 g	↓10.5*	↓10.5*	↓15.8*
Day 120-127	30 g	↓16.7	↓16.7*	↓23.2*	19 g	↓10.5	↓21.1*	↓21.1*
Day 127-134	28 g	↓10.7*	↓10.7	↓17.9*	21 g	↓19.0	↓28.6*	↓23.8*
Day 134-141	28 g	↓10.7*	↓10.7*	↓17.9*	20 g	↓15.0*	↓20.0*	↓25.0*
Day 141-148	29 g	↓6.9	↓6.9	↓17.2*	20 g	↓15.0	↓20.0*	↓20.0*
Day 148-155	28 g	↓10.7*	0.0	↓14.3*	20 g	↓10.0	↓20.0*	↓15.0*

(continued)

Table 2.6.7.7–3. 6-Month Study in Rats with a 4-Month Recovery Phase (Continued)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5 (Low)	1.5 (Mid)	3 (High)	0 (Control)	0.5 (Low)	1.5 (Mid)	3 (High)
Number of Toxicity Animals at Study Start	20	15	15	20	20	15	15	20
Day 155-162	29 g	↓10.3	↓13.8*	↓17.2*	20 g	↓15.0	↓20.0*	↓25.0*
Day 162-169	28 g	↓7.1	↓14.3*	↓21.4*	21 g	↓23.8*	↓28.6*	↓28.6*
Day 169-176	28 g	↓7.1	↓14.3*	↓10.7*	19 g	↓10.5*	↓15.8*	↓15.8*
Day 176-179	30 g	↓13.3	↓20.0	↓20.0	20 g	↓15.0	↓25.0*	↓30.0*
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Hematology								
Day 180								
Absolute Reticulocyte count (E3/μL)	225.8	147.8*	147.3*	137.7*	162.4	106.2*	129.5*	110.3*
Coagulation	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry								
Day 180								
Amylase Activity (U/L)	2430	2106	1945*	1666*	2178	1479*	1470*	1387*
Albumin (g/dL)	4.4	4.2	4.2*	4.1	5.9	5.2*	5.0*	4.9*
Calcium (mg/dL)[d]	12.3	11.9	11.8*	11.9	13.0	12.4*	12.3*	12.0*
Cholesterol (mg/dL)[e]	99	85	74*	81*	156	107*	104*	94*
Globulin (g/dL)	3.2	2.7	2.8	2.9	2.9	2.4*	2.4*	2.4*
Total Protein (g/dL)[f]	7.5	6.9*	6.9*	7.1*	8.7	7.6*	7.4*	7.2*
Triglyceride (mg/dL)[e]	41	29*	25*	21*	41	28*	25*	24*
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights								
Terminal Body Weight[c,g]	631 g	↓20*	↓24*	↓29*	314 g	↓20*	↓24*	↓23*
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.7–3. 6-Month Study in Rats with a 4-Month Recovery Phase (Continued)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5 (Low)	1.5 (Mid)	3 (High)	0 (Control)	0.5 (Low)	1.5 (Mid)	3 (High)
Number of Toxicity Animals at Study Start	20	15	15	20	20	15	15	20
Histopathology[h]								
Number of Animals Examined	15	15	14	14	15	15	15	15
Pancreas								
Atrophy, lobular								
Minimal	6	6	4	5	3	3	6	9
Slight	0	1	0	1	0	0	0	0
Depletion, zymogen								
Minimal	0	1	3	4	0	2	3	4
Slight	0	1	3	2	0	0	0	0
Atrophy, diffuse								
Minimal	0	0	2	1	0	1	2	2
Slight	0	0	0	1	0	1	0	0
Fibrosis, islet								
Minimal	9	7	2	3	0	0	0	0
Pigment, islet								
Minimal	9	6	2	2	0	0	0	0
Spleen								
Hematopoiesis, extramedullary								
Minimal	5	11	8	6	7	14	6	3
Slight	10	3	0	0	8	1	1	0
Marked	0	0	0	1	0	0	0	0
Skin/subcutis								
Atrophy, adipocyte								
Minimal	0	6	9	9	0	6	8	7
Slight	0	0	3	4	0	0	3	6
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Marrow, Femur								
Adipocytes, decreased								
Minimal	0	0	0	1	0	4	11	12
Adrenal, Cortex								
Vacuolation								
Minimal	5	6	1	1	–	–	–	–
Slight	4	1	0	0	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.7–3. 6-Month Study in Rats with a 4-Month Recovery Phase (Concluded)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5 (Low)	1.5 (Mid)	3 (High)	0 (Control)	0.5 (Low)	1.5 (Mid)	3 (High)
Number of Toxicity Animals at Study Start	20	15	15	20	20	15	15	20
Heart								
Cardiomyopathy								
Minimal	12	10	8	6	5	4	4	2
Recovery Phase								
Number of Toxicity Animals in Recovery	5	0	0	5	5	0	0	5
Body Weight (%)[c]								
Day 1	639 g	NA	NA	↓21.8*	329 g	NA	NA	↓30.1*
Day 112	721 g	NA	NA	↓3.7	395 g	NA	NA	↓15.4
Organ Weights								
Terminal Body Weight[c,g]	688	NA	NA	↓4	374	NA	NA	↓16
Histopathology[h]								
Pancreas								
Atrophy, lobular								
Minimal	4	NA	NA	4	2	NA	NA	3
Slight	0	NA	NA	0	0	NA	NA	1

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}96hr}$ = area under concentration-time curve from time 0 to 96 hours postdose; C_{max} = maximum (peak) observed drug concentration; GLP = Good Laboratory Practices; NA = not applicable; NR = not reported; SD = standard deviation; SEM = standard error of the mean; T_{max} = time to maximum concentration.

* = Statistically significant based on actual data (not on percent difference).

[a] Number of animals with active tirzepatide detected at end of test article administration on Day 176/total number of animals.

[b] No test article-related deaths occurred. One male (Animal B56642) administered 1.5 mg/kg was euthanized on Day 71 of the dosing phase due to an incidental fracture of the right front limb. One male (Animal B56674) administered 3 mg/kg was euthanized in moribund condition on Day 127 of the dosing phase; the cause of the moribund condition was attributed to spontaneous perforation of the aortic root.

[c] For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

[d] Associated with lower albumin concentration.

[e] Associated with lower body weights and/or lower food consumption.

[f] Due to minimally to mildly lower albumin and/or globulin concentrations.

[g] Decreases in organ weights effecting the liver, kidney, brain, spleen, epididymis, prostate, heart, thymus, ovary, adrenal, and thyroid/parathyroid were considered secondary to decreases in terminal body weight.

[h] Test article-related microscopic findings at the terminal sacrifice were considered primarily due to secondary effects of decreased terminal body weight and/or food consumption.

Table 2.6.7.7–4. 1-Month Study in Monkeys

Report title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Monkeys Given LY3298176 Once Weekly by Subcutaneous Injection for 1 Month

Species/strain: Cynomolgus monkeys | Duration of dosing: 1 month | Document ID: 8325823
Initial age: 2 to 3 years | Duration of reversibility: NA | GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]20[redacted] | Route: Subcutaneous injection | Test Article: Tirzepatide
NOAEL: 0.15 mg/kg | Vehicle: 10 mM tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2

Special features: Drug activity and jacketed external telemetry electrocardiogram examinations

Mean Toxicokinetics

Sample: Plasma | Analyte: Tirzepatide | Number of animals: 3/sex/group/time point
Feeding condition: Fed | Dose frequency: Weekly | Assay/Method: LC-MS/MS / 140501VKM_EII_R1
Drug activity: Cell-based assay: [redacted]-14-061-257 and [redacted]-14-061-253

Dose (mg/kg):	0.05		0.15		0.50	
Sex	M	F	M	F	M	F
Day 1						
$AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	28800	31700	84000	105000	346000	361000
SD $AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	4280	1460	9570	13200	31200	51700
C_{max} (ng/mL)	326	366	868	1280	4500	4550
SD C_{max} (ng/mL)	34.6	18.5	73.0	255	32.1	641
T_{max} (hr)	24.0	16.0	20.0	16.0	12.0	12.0
Day 29						
$AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	27600	39000	105000	124000	427000	421000
SD $AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	22300	2170	19800	10800	4190	45200
C_{max} (ng/mL)	459	468	1210	1510	5230	4600
SD C_{max} (ng/mL)	40.7	4.00	119	212	225	580
T_{max} (hr)	9.33	20.0	12.0	16.0	12.0	12.0
Drug activity[a]	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

(continued)

Table 2.6.7.7–4.　1-Month Study in Monkeys (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.05		0.15		0.50	
Sex:Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Noteworthy Findings								
Died or euthanized moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical signs[b]								
Thin body condition	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	14(3)[c]
Food consumption, low	0(0)	4(2)	4(1)	10(3)	10(3)	27(3)	13(3)	36(3)
Food consumption, none	0(0)	2(1)	0(0)	3(3)	1(1)	0(0)	0(0)	2(2)
Injection site findings	–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmology	–	–	–	–	–	–	–	–
Body temperature	–	–	–	–	–	–	–	–
Respiratory rates	–	–	–	–	–	–	–	–
Neurological examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiographic measurements								
Heart Rate (beats per minute)								
Day 8								
1 through 7 hours postdose	143	139	127	126	125	124	129	129
8 through 19 hours postdose	107	115	110	107	124	113	131	122
Day 22								
1 through 7 hours postdose	133	135	126	135	136	131	139	141
8 through 19 hours postdose	111	120	117	122	131	120	135	125
PR interval	–	–	–	–	–	–	–	–
QRS durations	–	–	–	–	–	–	–	–
QT interval	–	–	–	–	–	–	–	–
QTc interval	–	–	–	–	–	–	–	–
Body weight, kg, Day 31 (% change[d])								
Day 31 (kg)	3.1	3.0	3.0	2.6	3.0	2.5	2.7	2.3*
Mean body weight change, Day 1-31 (kg)	0.0	↑0.2	0.0	0.0	↓0.1	↓0.2*	↓0.3*	↓0.3*
% change Day 1-31	0%	↑3%	0%	0%	↓3%	↓7%	↓10%	↓15%
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.7–4.　1-Month Study in Monkeys (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.05		0.15		0.50	
Sex:Number of Animals	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3
Gross pathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ weight	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology (n[e])								
Pancreas								
Zymogen granules, decreased								
Minimal	0	0	0	0	0	2	2	3
Heart								
Atrophy, adipose tissue, epicardium								
Minimal	0	0	0	1	1	3	3	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Bone Marrow, Femur								
Atrophy, adipose tissue								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	0
Slight	0	0	0	0	0	1	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2
Skin/subcutis								
Atrophy, adipose tissue								
Minimal	0	0	0	2	2	0	1	0
Slight	0	0	0	1	0	3	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2

(continued)

Table 2.6.7.7–4.　1-Month Study in Monkeys (Concluded)

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; NOAEL = no-observed-adverse effect level; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] Number of animals with active tirzepatide detected at end of test article administration on Day 29/total number of animals.

[b] Total incidence; the first number is the number of occurrences, and the number in parentheses is the number of animals affected. Multiple observations for an animal on the same day were counted as a single occurrence.

[c] One female (Animal No. I10770) given 0.5 mg/kg had lost 0.2 kg since initiation and 0.3 kg from its peak predose body weight; this animal was hypoactive, dehydrated, and thin, and had low food consumption. Lactated Ringers solution fluid replacement therapy was given, along with additional fruit supplementation and fluid therapy.

[d] 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).

[e] Number of animals or tissues.

*p≤.05 (ANOVA and Dunnett’s test).

Table 2.6.7.7–5. 6-Month Study in Monkeys with a 4-Month Recovery Phase

Report Title: A Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetic Study in Monkeys Given LY3298176 Once Weekly by Subcutaneous Injection for 6 Months with a 4 Month Recovery Phase

Test Article: Tirzepatide

Species/Strain: Cynomolgus monkeys
Initial Age: 2 to 3 years
Date of First Dose: [redacted]20[redacted]

Duration of Dosing: 26 weeks
Duration of Recovery: 16 weeks
Method of Administration: Subcutaneous injection
Vehicle Control Article: 10 mM tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2

Document ID: 8336517

GLP Compliance: Yes

Special Features: Active Drug Assessment (ADA) Analysis[a]
No Observed Adverse Effect Level: 0.5 mg tirzepatide/kg

Mean Toxicokinetics								
Sample: Plasma	Analyte: Tirzepatide		Number of animals: 4/sex/group/time point					
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Weekly		Assay/Method: LC-MS/MS/140501VKM_EII_R1 Drug Activity: Cell-based assay: [redacted]-14-061-257 and [redacted]-14-061-253					
Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.05	0.15	0.5	0 (Control)	0.05	0.15	0.5
Number of Animals at Study Start	7	4	4	7	7	4	4	7
Dosing Phase								
Day 1								
C_{max} (ng/mL)	NR	306	1140	4590[b]	NR	336	1070	4800[b]
SD C_{max} (ng/mL)	NR	21.1	214	995[b]	NR	84.6	85.8	615[b]
$AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	NR	26200	91100	333000[b]	NR	28300	86500	340000[b]
SD $AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	NR	2370	11100	45200[b]	NR	4420	10200	27700[b]
T_{max} (hr)	NR	21.0	15.0	16.0[b]	NR	18.0	19.0	15.4[b]
Day 176								
C_{max} (ng/mL)	NR	389	1340	4190[b]	NR	438	1210	4580[b]
SD C_{max} (ng/mL)	NR	15.0	250	605[b]	NR	128	42.4	1030[b]
$AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	NR	34000	121000	342000[b]	NR	34100	102000	331000[b]
SD $AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	NR	3540	18300	19000[b]	NR	19300	11200	62000[b]
T_{max} (hr)	NR	21.0	13.0	10.9[b]	NR	16.0	18.0	10.9[b]
Drug activity[c]	NR	4/4	4/4	7/7	NR	4/4	4/4	7/7

(continued)

Table 2.6.7.7–5. 6-Month Study in Monkeys with a 4-Month Recovery Phase (Continued)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.05 (Low)	0.15 (Mid)	0.5 (High)	0 (Control)	0.05 (Low)	0.15 (Mid)	0.5 (High)
Number of Animals at Study Start	7	4	4	7	7	4	4	7
Dosing Phase								
Noteworthy Findings:								
Died or Sacrificed Moribund[d]	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations[e]								
Appearance, appears dehydrated	0(0)	0(0)	2(1)	5(5)	0(0)	0(0)	0(0)	3(3)
Qualitative Food Consumption								
Low, group observation	3(3)	0(0)	0(0)	3(3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Low, individual observation	237(6)	88(4)	119(4)	308(7)	50(5)	96(4)	158(4)	392(7)
None, individual observation	2(1)	1(1)	5(3)	6(4)	2(2)	7(3)	7(3)	9(6)
Body Weight (kg or %)[f]								
Day 1	3.0 kg	↓3.3	↓3.3	↑10.0	2.7 kg	↑11.1	↑3.7	↑7.4
Day 3	3.1 kg	↓6.5	↓6.5	↑3.2	2.7 kg	↑14.8	0.0	0.0
Day 5	3.1 kg	↓6.5	↓6.5	0.0	2.7 kg	↑14.8	↑3.7	0.0
Day 7	3.1 kg	↓6.5	↓9.7	0.0	2.7 kg	↑11.1	0.0	0.0
Day 12	3.1 kg	↓6.5	↓9.7	↓6.5	2.8 kg	↑10.7	↓3.6	↓7.1
Body Weight Change (kg)								
Day 1-3	0.0	↑0.1	↓0.1	↓0.1*	↓0.1	0.0	0.0	↓0.2
Day 3-5	0.0	0.0	0.0	0.0	↑0.1	0.0	↑0.1	0.0
Day 5-7	0.0	0.0	↓0.1	↓0.1	0.0	↓0.1	↓0.1	0.0
Day 7-12	0.0	0.0	↓0.1	↓0.1	↑0.1	↑0.1	0.0	↓0.1
Day 1-183	↑0.8	↑0.4*	↑0.4*	↑0.2*	↑0.2	↑0.1	↑0.1	↓0.2
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiographic Examinations								
Heart Rate (beats per minute)								
Day 8								
1 through 7 hours postdose	121	127	136	123	119	139	130	126
8 through 19 hours postdose	99	111	125	128	100	121	109	118
Day 78								
1 through 7 hours postdose	123	129	139	130	125	133	129	142
8 through 19 hours postdose	102	110	129	132	104	122	116	137
Day 169								
1 through 7 hours postdose	123	122	140	131	121	145	127	146
8 through 19 hours postdose	109	104	131	124	115	130	114	131

(continued)

Table 2.6.7.7–5. 6-Month Study in Monkeys with a 4-Month Recovery Phase (Concluded)

Sex	Male				Female			
Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.05 (Low)	0.15 (Mid)	0.5 (High)	0 (Control)	0.05 (Low)	0.15 (Mid)	0.5 (High)
Number of Animals at Study Start	7	4	4	7	7	4	4	7
Dosing Phase								
Hematology	–	–	–	–	–	–	–	–
Clinical Chemistry	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis	–	–	–	–	–	–	–	–
Urine Volume (mL)								
Day 85	88.1	167.3	121.5	190.9	164.7	98.4	121.1	99.3
Day 183	80.5	167.9	63.8	256.0*	138.3	63.4	165.0	59.1
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology[d]								
Number of Animals Examined	4	4	4	4	4	4	4	4
Pancreas								
Zymogen granules, decreased								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Recovery Phase								
Number of Animals in Recovery[g]	3	0	0	3	3	0	0	3

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}168hr}$ = area under concentration-time curve from time 0 to 168 hours postdose; GLP = Good Laboratory Practices; C_{max} = maximum (peak) observed drug concentration; NR = not reported; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum concentration.

* = Statistically significant based on actual data and not on percent difference ($p \leq 0.05$).

[a] ADA Analysis indicated tirzepatide was present in all animals administered tirzepatide. Some animals demonstrated measurable activity in predose and vehicle control samples, though this activity was one to two orders of magnitude lower than the activity levels in animals administered tirzepatide. Drug activity assays detected GLP1 and or GIP activity in these samples.

[b] 7 animals/sex/group/time point

[c] Number of animals with active tirzepatide detected at end of test article administration on Day 176/total number of animals.

[d] Number of animals or tissues.

[e] Total incidence; the first number is the number of occurrences, and the number in parentheses is the number of animals affected. Multiple observations for an animal on the same day were counted as a single occurrence.

[f] For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

[g] No test article-related findings noted during the recovery phase.

2.6.7.8.　Genotoxicity: In Vitro

Not applicable.

2.6.7.9. Genotoxicity: In Vivo

Table 2.6.7.9–1. Micronucleus Study in Rats

Report title: Tirzepatide (LY3298176): Rat Bone Marrow Micronucleus Assay

Test for induction of: Bone marrow micronuclei	Treatment schedule: A single administration at 0 hours (Day 1)	Document ID: 8395235
Species/strain: Male Sprague-Dawley rats (Crl:CD(SD))	Sampling time: 24 hours (Day 2, Subgroup 1) or 48 hours (Day 3, Subgroup 2) after dose administration	GLP compliance: Yes
Age: 7 to 8 weeks	Route: Subcutaneous injection (left hip)	Date of dosing: [redacted]20[redacted]
Cells evaluated: Polychromatic erythrocytes (PCE)	# of cells analyzed/animal: 4000 PCE	Test Article: Tirzepatide

Vehicle: 10 mM Tris, 150 mM sodium chloride and 0.02% Polysorbate 80 at pH 7.0
Special features: None
Genotoxic effects: None
Toxic/cytotoxic effects: Clinical signs of toxicity were observed for animals dosed at 3 mg/kg (48 hour sample): red staining to the snout and red colored eyes and skin observed for the majority of animals on Day 2 (equivalent times of immediate post dose to 4 hours post Day 1 dose). One animal also exhibited decreased activity. All animals were back to normal prior to necropsy on Day 3. Notable decreases in individual and group mean bodyweights measured from Day 1 to Day 2 (24 hour sample) or Day 1 to Day 3 (48 hour sample) as compared to the concurrent vehicle control groups.

Test Article	Dose (mg/kg)	Sampling Time (Hours After Final Administration)	# of Animals	Group Mean %PCE	Group Mean %Micronucleated PCE (±SD)
10 mM Tris, 150 mM sodium chloride (NaCl) and 0.02% polysorbate 80 at pH 7.0.	0	24	6M	36.73	0.17 (±0.06)
Tirzepatide (LY3298176)	0.75	24	6M	39.83	0.24 (±0.10) (NS)
Tirzepatide (LY3298176)	1.5	24	6M	39.10	0.12 (±0.05) (NS)
Tirzepatide (LY3298176)	3	24	6M	41.13	0.21 (±0.08) (NS)
Cyclophosphamide (CPA)	20	24	3M	38.40	2.62 (±0.71) ($p \leq 0.05$)
10 mM Tris, 150 mM sodium chloride (NaCl) and 0.02% Polysorbate 80 at pH 7.0	0	48	6M	43.67	0.22 (±0.08)
Tirzepatide (LY3298176)	3	48	6M	43.00	0.15 (±0.05) (NS)

Abbreviations: # = number; M = Male; mM = millimolar; NS = not significant; PCE = polychromatic erythrocytes; SD = standard deviation.
Not significant ($p > 0.05$)

2.6.7.10. Carcinogenicity

Table 2.6.7.10–1. 26-Week Study in RasH2 Mice

Report title: A Carcinogenicity and Toxicokinetic Study in 001178 RasH2 Mice Administered LY3298176 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 26 Weeks
Species/strain: Mouse/RasH2 | Duration of dosing: 26 weeks | Document ID: 8392063
Initial age: 8 to 9 Weeks | Route: Subcutaneous injection | GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]20[redacted] (males) or [redacted]20[redacted] (females) | Treatment of controls: Vehicle | Test Article: Tirzepatide
Vehicle: 10 mM Tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2
Special features: None

Composite Toxicokinetics

Sample: Plasma | Analyte: Tirzepatide | Number of animals: 3/sex/group/time point
Feeding condition: Fed | Dose frequency: Twice weekly | Assay/Method: LC-MS/MS/170034VKM_EII_R1 and 201224PVDJS_EII

Dose (mg/kg):	1		3		10		0 (Positive Control-MNU)	
Sex	M	F	M	F	M	F	M	F
Day 1								
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng•hr/mL)	109000	102000	359000	332000	1220000	1140000	NA	NA
SD $AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng•hr/mL)	11600	4530	12600	7700	39900	41600	NA	NA
C_{max} (ng/mL)	3500	3880	13500	11400	41100	39900	NA	NA
SD C_{max} (ng/mL)	612	206	624	321	5870	7740	NA	NA
T_{max} (hr)	4.00	12.0	12.0	12.0	4.00	4.00	NA	NA
Day 176								
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng•hr/mL)	166000	171000	484000	498000	1520000	1530000	NA	NA
SD $AUC_{0\text{-}24hr}$ (ng•hr/mL)	6280	4310	14600	6350	61200	51500	NA	NA
C_{max} (ng/mL)	5270	5660	15500	18500	45700	53100	NA	NA
SD C_{max} (ng/mL)	598	417	819	700	6990	2290	NA	NA
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	4.00	4.00	12.0	NA	NA

(continued)

Table 2.6.7.10–1. 26-Week Study in RasH2 Mice (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10		0 (Positive Control-MNU)	
Sex:Number of Animals	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:10	F:10
Noteworthy Findings										
Died or Euthanized Moribund (n)[a,b]	1	2	1	1	1	1	0	2	9	10
Survival to Terminal Sacrifice (n)[b]	24	23	24	24	24	24	25	23	1	0
Survival to Terminal Sacrifice (%)	96.0	92.0	96.0	96.0	96.0	96.0	100.0	92.0	10.0	0.0
Clinical Observations										
Physical appearance, thin	0	1	18	25	25	25	25	25	2	1
Posture, hunched	0	0	3	9	12	16	15	17	4	4
Body Weight, g (% change)[c,d]										
Day 5	23.7	18.9	↓7.2*	↓11.1*	↓15.6*	↓20.1*	↓17.7*	↓23.8*	↑3.4	↓1.6
Day 15	24.6	19.7	↓17.9*	↓21.3*	↓19.5*	↓24.9*	↓16.7*	↓24.9*	↑3.7	↓1.5
Day 36	25.6	20.6	↓16.8*	↓20.4*	↓18.4*	↓22.3*	↓15.2*	↓19.4*	↑5.5	↓3.9
Day 92	28.2	22.0	↓20.6*	↓18.2*	↓21.3*	↓23.6*	↓17.4*	↓19.5*	↑3.2	↑0.5
Day 182	31.2	22.4	↓24.0*	↓16.5*	↓24.4*	↓18.3*	↓22.4*	↓13.8*	↓8.7	NA
Body Weight Gain, g[d]										
Days 1–5	0.4	-0.3	-1.9*	-2.3*	-3.5*	-3.5*	-4.1*	-4.6*	0.3	-0.8
Days 12–15	0.1	0.3	-1.2*	-1.4*	-1.1*	-1.4*	0.2	-0.9*	0.1	-0.1
Days 33–36	0.1	0.0	-1.2*	-0.4*	-1.3*	-1.0*	-0.3	-0.3*	-0.1	-0.2
Days 89–92	-0.1	-0.1	-1.4*	-1.0*	-0.6	-1.1*	-0.6	-0.4	-0.2	-0.1
Days 180–182	-0.7	-1.4	-1.7*	-2.1*	-0.8	-1.3	-0.9	-0.6*	-0.6	NA
Days 1–182	7.8	3.3	-0.1*	-0.4*	0.1*	-0.3*	0.6*	0.3*	3.7	NA
Food Consumption, g/mouse/day (% change)[c,d]										
Days 1–5	3.4	2.6	↓41.2*	↓53.8*	↓50.0*	↓69.2*	↓41.2*	↓76.9*	↑2.9	↑7.7
Days 12–15	4.0	3.2	↓25.0*	↓56.3*	↓55.0*	↓56.3*	↓25.0*	↓59.4*	↑7.5	↓9.4
Days 33–36	4.1	3.5	↓48.8*	↓71.4*	↓43.9*	↓80.0*	↓26.8*	↓74.3*	↓2.4	↓17.1
Days 89–92	4.0	3.5	↓45.0*	↓60.0*	↓47.5*	↓62.9*	↓42.5*	↓71.4*	–	↓8.6
Days 180–182	4.5	4.0	↓46.7*	↓47.5*	↓71.1*	↓85.0*	↓60.0*	↓85.0*	↓26.7	NA
Ophthalmic Examinations	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.10–1. 26-Week Study in RasH2 Mice (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10		0 (Positive Control-MNU)	
Sex:Number of Animals	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:10	F:10
Hematology, Day 183										
Red blood cell count (E6/μL)	11.14	9.95	10.13*	9.72	10.05*	9.67	10.42*	9.68	10.09	NA
Hemoglobin concentration (g/dL)	15.7	15.4	14.5*	14.7*	14.5*	14.4*	15.0*	14.6*	14.4	NA
Hematocrit (%)	52.2	48.7	48.1*	46.9*	47.5*	46.0*	49.1*	46.6*	47.4	NA
White blood cell (E3/μL)	2.12	1.53	0.54*	0.56*	0.40*	0.43*	0.42*	0.63*	4.22	NA
Absolute neutrophil (E3/μL)	0.42	0.30	0.16*	0.18	0.10*	0.10	0.14*	0.22	2.49	NA
Lymphocyte (E3/μL)	1.57	1.12	0.37*	0.35*	0.26*	0.31*	0.24*	0.40*	1.58	NA
Monocyte (E3/μL)	0.04	0.02	0.01*	0.01*	0.00*	0.01*	0.00*	0.01*	0.06	NA
Eosinophil counts (E3/μL)	0.08	0.07	0.00*	0.02*	0.02*	0.01*	0.02*	0.01*	0.07	NA
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	14.1	–	14.3	–	14.4*	–	14.4*	–	14.2	NA
Mean corpuscular volume (fL)	–	49.0	–	48.2	–	47.6*	–	48.1*	–	NA
Absolute reticulocyte count (E3/μL)	322.8	–	297.2	–	305.8	–	280.6*	–	387.6	NA
Clinical Chemistry, Day 183										
Albumin concentration (g/dL)	3.7	3.8	4.0*	4.1*	3.8	4.2*	3.9*	4.1*	NA	NA
Globulin concentration (g/dL)	1.5	1.1	1.1*	1.0	1.2*	1.0	1.3*	1.0	NA	NA
Albumin:Globulin Ratio	2.5	3.5	3.7*	3.9	3.3*	4.3*	3.1*	4.2*	NA	NA
Alanine Aminotransferase Activity (U/L)	40	31	24*	40	28*	35	22*	22*	NA	NA
Alkaline Phosphatase Activity (U/L)	65	101	124*	118	116*	121	111*	141*	NA	NA
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Macroscopic Observations	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.10–1. 26-Week Study in RasH2 Mice (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10		0 (Positive Control-MNU)	
Sex:Number of Animals	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:10	F:10
Microscopic Observations										
Number of Animals Examined	25	25	25	25	25	25	25	25	NA	NA
Neoplastic Lesions	–	–	–	–	–	–	–	–	NA	NA
Non-Neoplastic Lesions (n)[b]										
Liver										
Decreased glycogen, hepatocyte										
Minimal	1	1	2	1	4	6	7	2	NA	NA
Slight	0	2	1	1	5	2	7	7	NA	NA
Skin/Subcutis										
Atrophy, adipocyte										
Minimal	0	0	0	4	0	4	0	5	NA	NA
Slight	0	0	6	0	11	2	10	3	NA	NA
Subcutaneous Injection Site, A										
Atrophy, adipocyte										
Minimal	1	0	8	3	3	7	4	5	NA	NA
Slight	1	0	12	2	6	2	21	3	NA	NA
Subcutaneous Injection Site, B										
Atrophy, adipocyte										
Minimal	0	0	12	5	3	8	4	7	NA	NA
Slight	1	0	7	2	19	1	20	5	NA	NA
Mandibular Salivary Gland										
Number Examined	25	24	25	25	25	25	25	25	NA	NA
Secretory depletion, duct										
Minimal	0	4	0	15	1	13	1	13	NA	NA
Slight	2	0	0	9	0	11	2	12	NA	NA
Ovary										
Decreased, corpora lutea										
Slight	NA	1	NA	25	NA	24	NA	20	NA	NA

(continued)

Table 2.6.7.10–1. 26-Week Study in RasH2 Mice (Concluded)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10		0 (Positive Control-MNU)	
Sex:Number of Animals	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:25	F:25	M:10	F:10
Non-Neoplastic Lesions (continued) (n)[b]										
Uterus										
Atrophy										
Minimal	NA	1	NA	13	NA	8	NA	12	NA	NA
Slight	NA	0	NA	10	NA	16	NA	12	NA	NA
Thymus										
Number Examined	25	23	24	24	23	24	24	23	NA	NA
Apoptosis, increased										
Minimal	0	1	2	8	3	9	6	6	NA	NA

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; AUC = area under the plasma concentration-time curve; BQL = below quantitation limit; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; MNU = N-methyl-N-nitrosourea; NA = not applicable; SD = standard deviation; SEM = standard error of the mean; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] One control male and 2 control females, 1 male and 1 female administered 1 mg/kg, 1 male and 1 female administered 3 mg/kg, and 2 females administered 10 mg/kg were found dead or moribund sacrificed between Days 54 and 177 of the dosing phase; these deaths were not considered tirzepatide related. Nine males and 10 female positive control animals were found dead or moribund sacrificed throughout the dosing phase; these deaths confirmed that the RasH2 model worked as intended.

[b] Number of animals or tissues.

[c] 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).

[d] Positive control group excluded from statistical analyses.

*p≤.05 (Dunnett's t-test or relevant method).

Table 2.6.7.10–2. 2-Year Study in Sprague Dawley Rats

Report title: A Carcinogenicity and Toxicokinetic Study in Rats Administered LY3298176 Twice Weekly by Subcutaneous Injection for 104 Weeks
Species/strain: Rat/Sprague Dawley | Duration of dosing: 88 weeks (males) or 84 weeks (females)[a] | Document ID: 8392734
Initial age: 6 to 7 Weeks | Route: Subcutaneous injection | GLP compliance: Yes
Date of first dose: [redacted]20[redacted] (males) or [redacted]20[redacted] (females) | Treatment of controls: Vehicle | Test Article: Tirzepatide
Vehicle: 10 mM Tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2
Special features: Active drug assessment

Composite Toxicokinetics

Sample: Plasma | Analyte: Tirzepatide | Number of animals: 3/sex/group/time point
Feeding condition: Fed | Dose frequency: Twice weekly | Assay/Method: LC-MS/MS/140498VKM_EII_R1

Dose (mg/kg):	0.15		0.5		1.5	
Sex	M	F	M	F	M	F
Toxicokinetics						
Day 1						
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	13700	14300	42000	44900	157000	135000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	459	772	3210	2490	10700	6050
C_{max} (ng/mL)	567	524	1380	1480	5660	4020
SD C_{max} (ng/mL)	53.5	125	367	235	1490	1100
T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	4.00
Day 358						
$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	16600	18600	49200	53300	130000	159000
SEM $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	894	585	3080	3120	4650	5790
C_{max} (ng/mL)	341	398	1050	1140	3060	3370
SD C_{max} (ng/mL)	80.9	67.5	175	56.9	294	310
T_{max} (hr)	12.0	12.0	24.0	12.0	12.0	12.0
Active Drug Assessment	–	–	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.10–2. 2-Year Study in Sprague Dawley Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.15		0.5		1.5	
Sex:Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Noteworthy Findings								
Died or Euthanized Moribund (n)[b]	41	40	30	30	33	32	40	23
Survival to Terminal Sacrifice (n)[b]	19	20	30	30	27	28	20	37
Survival to Terminal Sacrifice (%)	31.7	33.3	50.0	50.0	45.0	46.7	33.3	61.7
Clinical Observations (n)[b]								
Thin appearance	9	5	20	16	21	10	32	26
Body Weight, g (% change)[c]								
Day 8	293	208	↓4.1	↑1.4	↓12.6*	↓2.9*	↓18.8*	↓8.7*
Day 92	606	321	↓12.9*	↓6.2*	↓19.0*	↓13.1*	↓21.3*	↓15.9*
Day 183	728	374	↓15.1*	↓11.5*	↓21.7*	↓20.1*	↓22.3*	↓23.0*
Day 365	853	458	↓16.9*	↓15.9*	↓23.2*	↓26.6*	↓25.6*	↓31.9*
Day 547	927	501	↓18.1*	↓16.2*	↓27.4*	↓25.3*	↓29.3*	↓30.9*
Day 587 (last collection for females)	NA	502	NA	↓17.7*	NA	↓24.9*	NA	↓32.5*
Day 613 (last collection for males)	929	NA	↓20.6*	NA	↓26.6*	NA	↓31.5*	NA
Food Consumption, g/rat/day (% change)[c]								
Days 1–8	30	20	↓16.7*	↓10.0*	↓33.3*	↓25.0*	↓46.7*	↓35.0*
Days 85–92	30	20	↓13.3*	↑0.0	↓13.3*	↓15.0*	↓13.3*	↓35.0*
Days 176–183	33	20	↓12.1*	↑0.0	↓21.2*	↓10.0*	↓18.2*	↓15.0*
Days 358–365	32	20	↓9.4*	↑5.0	↓12.5*	↓5.0	↓12.5*	↓10.0*
Days 540–547	32	22	↓12.5*	↑4.5	↓12.5*	↓9.1	↓12.5*	↓22.7*
Days 575–582 (last collection for females)	32	22	↓3.1	↑0.0	↓6.3	↓13.6*	↓6.3	↓13.6*
Days 610–613 (last collection for males)	34	NA	↓23.5*	NA	↓20.6*	NA	↓20.6*	NA
Number of Carcinogenicity Animals with Masses	20	38	15	32	14	29	12	19
Macroscopic Observations (n)[b]								
Thyroid								
Cyst	0	0	0	0	0	0	1	0
Discolored	0	0	2	1	1	3	2	2
Large	0	1	2	4	4	1	1	4
Mass	0	0	0	1	1	0	1	1

(continued)

Table 2.6.7.10–2. 2-Year Study in Sprague Dawley Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.15		0.5		1.5	
Sex:Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Microscopic Observations								
Neoplastic Lesions (n)[b]								
Thyroid								
Number of Animals Examined	60	59	60	60	60	60	60	60
Adenoma, C-cell	6	4	19*	19	29*	30	38*#	31*#
Carcinoma, C-cell	0	1	4	3	8*	2	2	6##
Adenoma and carcinoma, C-Cell	6	5	20*	20*	33*	30*	39*#	34*#
Non-Neoplastic Lesions (n)[b]								
Adrenal, Cortex								
Number of Animals Examined	60	60	60	60	60	60	60	60
Hypertrophy/hyperplasia, zona glomerulosa, diffuse								
Minimal	2	6	1	3	5	7	4	8
Slight	7	3	16	4	20	17	13	18
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	1
Skin/Subcutis								
Number of Animals Examined	60	60	60	60	60	60	60	60
Atrophy, adipose tissue								
Minimal	8	0	12	8	7	3	12	9
Slight	2	1	4	5	12	9	16	15
Moderate	0	0	4	2	2	4	7	4

(continued)

Table 2.6.7.10–2. 2-Year Study in Sprague Dawley Rats (Concluded)

Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.15		0.5		1.5	
Sex:Number of Animals	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60
Non-Neoplastic Lesions (continued) (n)[b]								
Thyroid								
Number of Animals Examined	60	59	60	60	60	60	60	60
Hyperplasia, C-cell, focal								
Minimal	5	0	6	10	8	8	5	4
Slight	1	7	1	6	5	4	8	5
Moderate	4	0	7	6	10	13	12	18
Marked	0	0	6	1	2	3	13	5
Severe	0	0	0	0	1	0	1	0

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; SD = standard deviation; SEM = standard error of the mean; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] All remaining animals were sacrificed early due to low survival in the vehicle control group (≤20 rats/sex).

[b] Number of animals or tissues.

[c] 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).

* Significant ($p<0.05$).

\# Significant trend ($p<0.01$).

\## Significant trend ($p<0.05$).

2.6.7.11. Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies

Table 2.6.7.11–1. Nonpivotal Reproductive and Developmental Toxicity Studies

Species, Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	#/Sex /Group	Noteworthy Findings	Document ID
Rat, Crl:CD(SD)	SC	GD 6, 10, 13, and 17	0[a], 0.1, 0.5, 1.5, 3.0	5	Effects on embryo survival, fetal weight and external morphology, occurred concomitantly with significant ↓ in maternal body weight and food consumption.	WIL-353352
Rabbit, NZW	SC	GD 7 and 14	0[a], 0.01, 0.05, 0.1, 0.5	5	Maternal toxicity was characterized by severe body weight effects, ↓ mean food consumption, and corresponding increased incidences of ↓ defecation at 0.5 mg/kg, and was considered to have exceeded the MTD in pregnant rabbits. Mean bodyweight loss and ↓ food consumption were noted. Intrauterine growth in the 0.01 and 0.05 mg/kg groups and survival and external fetal morphology in the 0.01, 0.05, and 0.1 mg/kg groups were unaffected.	WIL-353353
Rat, Crl:CD(SD)	SC	Every Four days from PND 21-41	0[a], 0.15, 0.5, 1.5	10	Pharmacological dose-dependent, ↓ mean body weight gains or body weight losses were generally noted for males and females in tirzepatide-dosed groups on the days following dosing. Generally ↓ mean food consumption was also noted for males at 0.15 and 0.5 mg/kg and males and females at 1.5 mg/kg following dosing. On nondosing days, mean body weight gains were generally comparable to or ↑ than the control group. During PND 22–45, mean absolute body weights were up to 25.0% ↓ for males and females at 1.5 mg/kg up to 20.3% and 13.0% ↓ for males and females, respectively, at 0.5 mg/kg, and up to 10.7% ↓ for males at 0.15 mg/kg.	00353459

Abbreviation: ↓ = decrease; ↑=increase; # = number; GD = gestation day; Crl: CD(SD)=Charles River Sprague Dawley; SC = subcutaneous. NZW = New Zealand White; PND=postnatal day.

[a] Vehicle = [10 mM tris, 150 mM sodium chloride (NaCl) and 0.02% Polysorbate 80, pH 7 ± 0.2].

2.6.7.12. Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development

Table 2.6.7.12–1. Fertility Study in Male Rats

Report title: A Male Fertility and Toxicokinetic Study of LY3298176 Administered Twice Weekly by Subcutaneous Injection in Sprague Dawley Rats

Design similar to ICH4.1.1: Yes
Duration of dosing: Males: Twice weekly, 4 weeks prior to mating until euthanasia (total of 19 doses)
Females: untreated
Document ID: 00353430

Species/strain: Rat/Crl:CD(SD)
Day of mating: Gestation Day 0
GLP compliance: Yes

Initial age: 8 weeks of age
Day of C-section: Gestation Day 15 (untreated females)
Test Article: Tirzepatide

Date of first dose: [redacted]20[redacted]
Route: Subcutaneous injection

Vehicle: 10 mM tris, 150 mM sodium chloride, and 0.02% polysorbate 80, pH 7 ± 0.2/solution

Special features: Toxicokinetics

No-observed-adverse-effect level:

F_0 Male general toxicity:	Not established
F_0 Male Reproductive Toxicity:	3.0 mg/kg
F_1 development:	3.0 mg/kg

Composite Toxicokinetics

Sample: Plasma
Analyte: Tirzepatide
Number of animals: 3 animals/group/time point

Feeding condition: Fed
Dose frequency: Twice weekly
Assay/Method: HRAM LC/MS / 140498VKM_EII_R1

	Dose (mg/kg): 0.5	1.5	3.0
Males			
Study Day 0			
$AUC_{0\text{-}72hr}$ (ng•hr/mL)	38700	135000	257000
C_{max} (ng/mL)	1120	4450	8240
T_{max} (hr)	12	12	4
Study Day 28			
$AUC_{0\text{-}72hr}$ (ng•hr/mL)	42800	145000	241000
C_{max} (ng/mL)	1370	4730	9110
T_{max} (hr)	12	12	12
Drug activity[a]	24/25	25/25	25/25

(continued)

Table 2.6.7.12–1. Fertility Study in Male Rats (Concluded)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	3.0
Number evaluated	25	25	25	25
Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
Clinical observations	–	–	–	–
Necropsy observations	–	–	–	–
Body weight gain, g, Days 0-28 (premating) (% change[b])	170	↓15.9**	↓26.5**	↓27.1**
Body weight gain, g, Days 0-65 (% change[b])	292	↓25.7**	↓38.0**	↓41.4**
Food consumption, cumulative, g/rat, Days 1-28 (% change[b])	25	↓16**	↓24**	↓28**
Organ Weights g (%)[b]				
Brain	2.18	↓1.4	↓2.8*	↓2.8*
Epididymis, right	0.70	↓2.9	↓5.7*	↓5.7*
Number of males that mated	25	25	25	24
Number of fertile males	25	25	25	23
Sperm motility (%)	82	81	81	81
Females (untreated)				
Number evaluated	25	28	25	25
Mean Estrous Cycle Length (days)	4.2	4.6	4.1	4.1
Mean Precoital Interval (days)	2.4	2.6	2.7	2.8
No. Pregnant	25	25	25	23
Mean No. of Corpora Lutea	16.8	16.0	16.8	17.0
Mean No. of Implantations	15.8	14.7	15.9	16.0
Mean % Preimplantation Loss	5.6	7.1	5.4	5.6
Mean No. Viable Embryos	14.9	13.6	15.0	15.1
Mean No. Resorptions	0.9	1.1	0.9	0.9
Mean No. Dead Embryos	0	0	0	0
Mean % Postimplantation Loss	5.6	7.9	5.8	5.5

Abbreviations: # = number; ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; F = female; M = male; NA = not applicable; T_{max} = time to maximum concentration. * $p<0.05$ ** $p<0.01$ when compared to the control group using Dunnett's test

[a] Number of animals with active tirzepatide detected on Day 65/total number of animals.

[b] 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).

Table 2.6.7.12–2. Fertility and Early Embryonic Development Study in Female Rats

Report title: A Fertility and Early Embryonic Development and Toxicokinetic Study with LY3298176 Administered by Subcutaneous Injection in Female Sprague Dawley Rats

Design similar to ICH4.1.1: Yes

Duration of dosing: Twice-weekly for 2 weeks prior to cohabitation (Study Days 0, 4, 7, 11, and 14), during the cohabitation period (Study Days 18, 21, 25, and 28 [as necessary]) until mating was confirmed, and through GD 6 (Gestation Days 3 and 6)

Document ID: WIL-353356

Species/strain: Rat, Crl:CD(SD)

Day of mating: GD 0

GLP compliance: Yes

Initial age: 11 weeks

Day of C-section: GD 15

Test Article: Tirzepatide

Date of first dose: [redacted]20[redacted]

Route: Subcutaneous injection

Vehicle: 10 mM tris, 150 mM sodium chloride, and 0.02% polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2

Special features: Toxicokinetics

No-observed-adverse-effect level:

- F_0 general toxicity: Not established
- F_0 fertility: Not established
- F_1 development: Not established

Mean Toxicokinetics

Sample: Plasma | Analyte: Tirzepatide | Number of animals: 4 animals/group/time point

Feeding condition: Fed | Dose frequency: Twice weekly | Assay/Method: HRAM LC/MS / 140498VKM_EII_R1

Females	Dose (mg/kg)	0.5	1.5	3.0
Study Day 0				
	$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	46400	130000	254000
	SD $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	5750	3670	28800
	C_{max} (ng/mL)	1430	3810	7330
	SD C_{max} (ng/mL)	170	512	772
	T_{max} (hr)	12.0	12.0	12.0
GD 6				
	$AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	41900	129000	269000
	SD $AUC_{0\text{-}96hr}$ (ng•hr/mL)	4430[a]	21700[a]	45800
	C_{max} (ng/mL)	1380	4560	9340
	SD C_{max} (ng/mL)	217[a]	509[a]	1840
	T_{max} (hr)	12.0[a]	9.33[a]	10.0
Drug activity[e]		3/3	3/3	2/2

(continued)

Table 2.6.7.12–2. Fertility and Early Embryonic Development Study in Female Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	3.0
Number evaluated	20	20	20	20
Number died or euthanized moribund	0	0	1[d]	0
Clinical observations (n[b])				
Dried red material around nose	6	10	13	11
Decreased defecation	0	0	0	5
Body weight, g, (% change[c])				
Premating Day 14	247	↓5.7*	↓8.9**	↓9.7**
Gestation Day 0	251	↓12.7**	↓10.8**	↓12.0**
Gestation Day 15	320	↓5.0	↓4.4	↓4.1
Body weight gain, g, (% change[c])				
Premating Days 0-14	15	↓80**	↓147**	↓140**
Gestation Days 0-3	16	↑106**	↑75**	↑87.5**
Gestation Days 3-6	9	↓77.8	↓211.1**	↓233.3**
Gestation Days 10-15	27	↑14.8	↑37**	↑44.4**
Food consumption, cumulative, g/rat, (% change[c])				
Premating Day 0-4	13	↓46.2**	↓53.9**	↓61.5**
Premating Day 4-7	12	↓25**	↓41.7**	↓41.7**
Premating Day 7-11	12	0	↓33.4**	↓33.4**
Premating Day 11-14	13	↓30.8**	↓76.9**	↓61.5**
Gestation Days 0-10	18	↓11.1*	↓50**	↓50**
Gestation Days 10-15	20	↑25**	↑10	↑15
Necropsy observations	–	–	–	–
Mating index (%)	100	100	100	100
Fertility index (%)	95.0	90.0	94.7	95.0
Estrous Cycle Length (days)	4.6	4.9	6.2	4.9
Pre-Coital Interval (days)	3.0	2.2	2.6	2.6
Number of live fetuses/litter	13.4	11.6	10.6**	11.3*
Number early in utero deaths (%)	5.9	7.7	8.3	4.9
Number late in utero deaths	0.0	0.0	0.0	0.0

(continued)

Table 2.6.7.12–2. Fertility and Early Embryonic Development Study in Female Rats (Concluded)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.5	1.5	3.0
Number early and late in utero deaths	0.9	0.9	0.9	0.6
Mean number corpora lutea/dam	15.7	14.2	13.2*	13.2*
Mean number implantation/dam	14.3	12.6	11.4**	11.9**
Mean preimplantation loss/litter (%)	7.5	9.7	12.4	9.1

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; – = no important findings; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; GD = Gestation Day; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] 3 animals/group/time point

[b] Number of animals or tissues.

[c] 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).

[d] Calculi of the kidneys were noted at necropsy; this death was not attributed to tirzepatide administration.

[e] Number of animals with active tirzepatide on GD6/total number of animals.

*p≤05, **p≤.01 (Dunnett's test).

2.6.7.13. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryo-Fetal Development

Table 2.6.7.13–1. Embryo-Fetal Development Study in Rats

Report title: An Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study of LY3298176 Administered by Subcutaneous Injection on Gestation Days 6, 10, 13 and 17 in Sprague-Dawley Rats

Design similar to ICH4.1.3: Yes
Species/strain: Crl:CD(SD)
Initial age: approximately 12 weeks
Date of first dose: [redacted]20[redacted]
Duration of dosing: Gestation Days 6, 10, 13, and 17
Day of mating: Gestation Day 0
Day of C-section: Gestation Day 20
Route: Subcutaneous Injection
Document ID: WIL-353354
GLP compliance: Yes
Test Article: Tirzepatide
Vehicle: 10 mM Tris, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2
Special features: Drug Activity
No-observed-adverse-effect level: F_0 general toxicity: 0.02 mg/kg
F_1 development: 0.1 mg/kg
F_1 survival and morphology: 0.1 mg/kg

Mean Toxicokinetics

Sample: Plasma	Analyte: Tirzepatide	Number of animals: 4 animals/group/time point
Feeding condition: Fed	Dose frequency: On GD 6, 10, 13, and 17	Assay/Method: HRAM LC/MS / 140498VKM_EII_R1
		Drug Activity: Cell-based assay: [redacted]-14-061-255 and [redacted]-14-061-251

Dams	Dose (mg/kg)	0.02	0.1[a]	0.5
GD 6				
	$AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	NA [g]	8570	53200
	SD $AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	NA [g]	1220	12700
	C_{max} (ng/mL)	26.2[b]	329	1740
	SD C_{max} (ng/mL)	NA	66.9	331
	T_{max} (hr)	4[b]	7	12
GD 17				
	$AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	821	4010	35800
	SD $AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	393	1490	3650
	C_{max} (ng/mL)	52.2	174	1480
	SD C_{max} (ng/mL)	17.0	46.6	287
	T_{max} (hr)	10	12	8
	Drug Activity[c]	29/29	28/28	28/28

(continued)

Table 2.6.7.13–1. Embryo-Fetal Development Study in Rats (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.1	0.5
Dams	Number pregnant	24	25	25	24
	Number died or euthanized moribund	0	0	0	0
	Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
	Clinical observations (n[d])				
	Decreased defecation	0	0	12	12
	Necropsy observations	–	–	–	–
	Body Weight g (% change[e])				
	Gestation Day 7	286	↓2.4	↓8.0**	↓11.9**
	Gestation Day 8	291	↓1.0	↓5.8**	↓15.8**
	Gestation Day 9	295	↓0.7	↓2.7	↓12.5**
	Gestation Day 10	303	↓2.0	↓4.0**	↓8.6**
	Gestation Day 11	312	↓3.8*	↓11.5**	↓18.6**
	Gestation Day 12	316	↓1.9	↓7.6**	↓17.1**
	Gestation Day 13	321	↓1.2	↓4.0**	↓11.5**
	Gestation Day 14	327	↓3.4	↓11.6**	↓21.4**
	Gestation Day 15	334	↓1.2	↓6.6**	↓18.3**
	Gestation Day 16	342	↓0.6	↓5.0**	↓11.7**
	Gestation Day 17	356	↓1.4	↓5.3**	↓11.0**
	Gestation Day 18	371	↓2.4	↓10.0**	↓19.4**
	Gestation Day 20	407	↓1.2	↓5.7**	↓12.5**
	Body weight gain, g (% change[e])				
	Gestation Days 6-10	23	↓30.4**	↓43.5**	↓117.4**
	Gestation Days 10-13	17	↑17.6	0	↓52.9**
	Gestation Days 13-18	50	↓12	↓46**	↓70**
	Gestation Days 6-18	90	↓10*	↓37.8**	↓80**
	Net Body Weight (g)	321.5	315.5	300.9**	287.2**

(continued)

Table 2.6.7.13–1. Embryo-Fetal Development Study in Rats (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.1	0.5
Dams (continued)	Food consumption, g/rat/day (% change[e])				
	Gestation Day 6-10	22	↓4.5	↓13.6**	↓63.6**
	Gestation Days 10-13	25	↓8**	↓28**	↓48**
	Gestation Days 13-18	26	↓3.8	↓19.2**	↓38.5**
	Gestation Days 6-18	25	↓8*	↓20**	↓48**
	Mean number corpora lutea/dam	15.7	16.0	15.6	15.9
	Mean number implantations/dam	15.1	15.3	14.9	15.1
	Mean Uterine weight (g)	85.6	86.6	83.5	68.8**

(continued)

Table 2.6.7.13–1. Embryo-Fetal Development Study in Rats (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.1	0.5
Litters	Number of litters evaluated	24	25	25	24
	Number of in utero deaths/litter (early)	6.9	5.8	6.5	9.7
	Number of in utero deaths/litter (late)	0	0	0	0.6
	Number of live fetuses/litter	14.1	14.4	13.9	13.5
	Fetal weight (grams, gender combined)	4.0	3.9	3.9	3.2**
	Fetal sex ratios (% male)	53.7	52.1	50.8	53.4
	Fetal anomalies (number of fetuses [litters] examined)	338[24]	360[25]	347[25]	324[24]
	External malformations:				
	Absolute No. (% per littler)				
	Fetal anasarca	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.4)
	Proboscis-like nose	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
	Microstomia	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
	Microphthalmia and/or anophthalmia	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
	Visceral malformations:				
	Absolute No. (% per litter)				
	Situs inversus	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	2 (0.6)
	Interventricular septal defect	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)
	Lungs-lobular dysgenesis	0 (0.0)	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)
	Double aorta	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
	Visceral variations:[f]				
	Absolute No. (% per litter)				
	Major blood vessel variation	5 (1.6)	3 (0.8)	0 (0.0)	28 (8.7) *
	Skeletal malformations:				
	Absolute No. (% per litter)				
	Rib anomaly	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (1.9)
	Costal cartilage anomaly	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.6)

(continued)

Table 2.6.7.13–1. Embryo-Fetal Development Study in Rats (Concluded)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.1	0.5
Litters, continued	Fetal anomalies (number of fetuses [litters] examined)	338[24]	360[25]	347[25]	324[24]
	Skeletal malformations, concluded				
	Absolute No. (% per litter)				
	Bent limb bones	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.8)
	Skeletal variations:[f]				
	Absolute No. (% per litter)				
	Sternebra(e) nos. 5 and/or 6 unossified	12 (3.5)	11 (3.1)	7 (1.8)	43 (14.1)
	Reduced ossification of the 13th rib(s)	1 (0.2)	2 (0.5)	4 (1.1)	9 (2.7)
	Cervical centrum no. 1 ossified	75 (22.7)	67 (18.7)	70 (19.8)	13 (3.8) **
	Reduced ossification of the vertebral arches	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (0.3)	9 (3.4)
	Sternebra(e) nos. 1, 2, 3, and/or 4 unossified	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	26 (8.2)
	Reduced ossification of the skull	1 (0.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (2.9)

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; GD = Gestation Day; NA = not applicable; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum concentration.

[a] 3 animals/group/time point

[b] 2 animals/group/time point

[c] Number of animals with active tirzepatide detected at end of administration (GD 17)/total number of animals.

[d] Number of animals or tissues.

[e] 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).

[f] Individual fetuses may occur in more than one category.

[g] Among 4 animals allocated to 0.02mg/kg TK group, 2 animals were excluded as outliers. For the other 2 animals, $AUC_{0\text{-last}}$ was not reportable due to insufficient tirzepatide concentration data above BLQ.

*p≤05, **p≤.01 (Dunnett's test).

Table 2.6.7.13–2. Embryo-Fetal Development Study in Rabbits

Report title: An Embryo-Fetal Development and Toxicokinetic Study of LY3298176 Administered by Subcutaneous Injection on Gestation Days 7 and 14 in New Zealand White Rabbits

Design similar to ICH4.1.3: Yes
Duration of dosing: GD 7 and 14
Document ID: WIL-353355
Species/strain: Rabbit/ Hra:(NZW)SPF
Day of mating: GD 0
GLP compliance: Yes
Initial age: 6-7 months
Day of C-section: GD 29
Test Article: Tirzepatide
Date of first dose: [redacted]20[redacted]
Route: Subcutaneous injection
Vehicle: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% polysorbate 80, pH 7.0 ± 0.2
Special features: Toxicokinetics, Drug activity and Histology
No-observed-adverse-effect level:

- F_0 general toxicity: Not established
- F_1 development: 0.03 mg/kg
- F_1 survival and morphology: 0.03 mg/kg

(continued)

Table 2.6.7.13–2. Embryo-Fetal Development Study in Rabbits (Continued)

Mean Toxicokinetics				
Sample: Plasma	Analyte: Tirzepatide		Number of animals: 4 animals/group/time point	
Feeding condition: Fed	Dose frequency: GD 7 and 14		Assay/Method: HRAM LC/MS / 151686VKM_EII_R1 Drug Activity: Cell-based reporter / [redacted]-15-061-365 and [redacted]-15-061-367	
	Dose (mg/kg):	0.01	0.03	0.1
Dams				
GD 7				
	C_{max} (ng/mL)	54.3	192	632
	SD C_{max} (ng/mL)	8.91	6.85	69.7
	$AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	3220	14000	55500
	SD $AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	334	959	3360
	$AUC_{0\text{-}last}$ (ng•hr/mL)	2940	14000	55500
	SD $AUC_{0\text{-}last}$ (ng•hr/mL)	356	959	3360
	T_{max} (hr)	24	24	24
GD 14				
	C_{max} (ng/mL)	46.6	159[a]	567
	SD C_{max} (ng/mL)	2.92	37.0[a]	14.2
	$AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	3560	14700[a]	56400
	SD $AUC_{0\text{-}168hr}$ (ng•hr/mL)	450	2450[a]	2380
	$AUC_{0\text{-}last}$ (ng•hr/mL)	3290	14700[a]	56400
	SD $AUC_{0\text{-}last}$ (ng•hr/mL)	355	2450[a]	2380
	T_{max} (hr)	36	40[a]	30
	Drug Activity[b]	26/26	26/26	25/25

(continued)

Table 2.6.7.13–2. Embryo-Fetal Development Study in Rabbits (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
Dams	Number evaluated	22	22	22	22
	Number pregnant	22	22	22	21
	Number died or euthanized moribund	0	3[f]	1[f]	3[f]
	Number aborted	0	0	1[g]	2[g]
	Clinical observations (n[c])				
	Decreased defecation	6	9	13	22
	Soft feces	2	2	6	11
	Brown material findings	5	5	9	9
	Body weight g (%)[e]				
	Gestation Day 9	3573	↓0.6	↓4.3	↓8.6**
	Gestation Day 15	3745	↓0.1	↓4.2	↓7.4**
	Gestation Day 21	3860	↓1.6	↓3.0	↓7.3**
	Gestation Day 29	3951	↓1.1	↓2.3	↓2.8
	Body Weight Change (g)				
	Gestation Days 7-10	130	79	↓26**	↓223**
	Gestation Days 10-14	105	144	161*	290**
	Gestation Days 7-14	235	222	134*	67**
	Gestation Days 14-17	85	46	↓1**	↓77**
	Gestation Days 17-21	68	52	126	98
	Gestation Days 14-21	153	103	125	34*
	Gestation Days 7-21	388	306	259	105**
	Gestation Days 21-29	90	94	111	212**
	Net Body Weight Change (g)	117.4	73.7	↓0.4	13.1
	Food consumption, g(%)[e]				
	Gestation Days 7-10	190	↓13.2	↓46.3**	↓77.9**
	Gestation Days 10-14	178	↓0.56	↓21.3**	↓28.1**
	Gestation Days 14-17	184	↓15.8	↓39.7**	↓53.8**
	Gestation Days 17-21	187	↓16.0	↓16.6	↓43.3**
	Gestation Days 21-29	118	↓1.7	↓10.2	↑16.9

(continued)

Table 2.6.7.13–2. Embryo-Fetal Development Study in Rabbits (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
Dams (continued)	Necropsy observations (n[c])				
	Duodenum, white area(s)	0	1	0	1
	Duodenum, eroded area(s)	0	0	0	1
	Duodenum, perforation	0	2	0	0
	Duodenum, thin area(s)	0	1	0	0
	Histopathology observations				
	Duodenum[c]	22	19/(2)[d]	21	19/(1)[d]
	Ulceration/Perforation	0	(1)	0	1
	Marked	–	0	–	1
	Severe	–	(1)	–	0
	Necrosis	0	(1)	0	1
	Severe	–	(1)	–	1
	Inflammation, necrotizing	0	(1)	0	0
	Severe	–	(1)	–	–
	Stomach[c]	22	19/(1)[d]	21	19/(1)[d]
	Ulceration	0	(1)	1	0
	Moderate	–	0	1	–
	Marked	–	(1)	0	–
	Necrosis	0	(1)	2	1
	Minimal	–	0	1	1
	Mild	–	0	0	0
	Moderate	–	0	0	0
	Marked	–	(1)	1	0
	Inflammation, heterophil, non-glandular region	0	3 (1)	3	1
	Minimal	–	1	0	0
	Mild	–	0	2	1
	Moderate	–	2/(1)	0	0
	Marked	–	0	1	0
	Mean number corpora lutea/dam	9.5	10.2	10.0	10.7
	Mean number implantations/dam	8.9	9.2	9.3	8.9

(continued)

Table 2.6.7.13–2. Embryo-Fetal Development Study in Rabbits (Concluded)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.01	0.03	0.1
Litters	Number of litters evaluated	22	19	20	16
	Number of live fetuses/litter	8.4	8.8	8.6	8.3
	Number of early resorptions/litter	0.4	0.3	0.4	0.4
	Number of late resorptions/litter	0.1	0.0	0.4	0.1
	Number of dead fetuses/litter	0	0	0	0
	Body weight of live male fetuses (g)	43.9	41.1	41.9	39.6
	Body weight of live female fetuses (g)	41.8	41.0	39.6	39.1
	Sex ratio (%male/%female)	43.6/56.4	49.4/50.6	44.5/55.5	50.1/49.9
	Fetal anomalies	–	–	–	–

Abbreviations: ↑ = increase; ↓ = decrease; - = no noteworthy findings; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; GD = Gestation Day; NA = not applicable; SD = standard deviation; T_{max} = time to maximum concentration.

a 3 animals/group/time point

b Number of animals with active tirzepatide detected at end of administration (GD 14)/total number of animals.

c Number of animals or tissues.

d All animals were evaluated, including the found dead (FD) animals. The number of FD animals examined were indicated by (). The incidence of any associated microscopic findings within theses FD animals were indicated in the respective tissue/diagnosis with ().

e 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).

f In the 0.1-mg/kg group, embryo-fetal development phase females were either found dead (2) or euthanized in extremis (1), on Gestation Days 19, 21, and 24. An additional embryo-fetal development phase female in the 0.03-mg/kg group was found dead on Gestation Day 27. All of these rabbits had marked body weight losses and reduced food consumption with corresponding decreased defecation for several days prior to death. One toxicokinetic phase female in the 0.03-mg/kg group was euthanized on Gestation Day 16 due to prolonged effects on body weight and food consumption. In the 0.01-mg/kg group, 3 females were found dead between Gestation Days 18 and 22, one of which aborted prior to death.

g In the 0.1-mg/kg group 2 females aborted on GD 26 and GD 28. One female in the 0.03-mg/kg group aborted on GD 25. These were considered secondary to the findings observed with the stomach and duodenum.

*p<05, **p<.01 (Dunnett’s test).

2.6.7.14. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development

Table 2.6.7.14–1. Pre- and Postnatal Development Study in Rats

Report title: A Pre- and Postnatal Development Study, Including Maternal Function, of LY3298176 Administered Twice Weekly by Subcutaneous Injection in Sprague Dawley Rats

Design similar to ICH4.1.2? Yes | Duration of dosing: GD 6, 10, 13, 17, and 20; LD 4, 7, 11, 14, and 18 | Document ID: 00353460

Species/strain: Rat/Crl:CD(SD) | Day of mating: GD 0 | GLP compliance: Yes

Initial age: 11-12 weeks | Litters culled / not culled: Culled | Test Article: Tirzepatide

Date of first dose: [redacted]20[redacted] | Route: Subcutaneous Injection

Vehicle: 10 mM tris buffer, 150 mM sodium chloride (NaCl) and 0.02% Polysorbate 80, pH 7 ± 0.2/Solution

Special features: Toxicokinetics, active drug assessment, and histopathology

No-observed-adverse-effect level: F_0 general toxicity and reproduction: 0.10 mg/kg
F_1 growth: 0.10 mg/kg
F_1 Males: 0.10 mg/kg
F_1 Females: 0.25 mg/kg
F_1 Reproductive: 0.25 mg/kg

Sample: Plasma | Analyte: Tirzepatide | Number of animals: 4 animals/group/time point

Feeding condition: Fed | Dose frequency: Twice weekly | Assay/Method: HRAM LC/MS / 140498VKM_EII_R1

Drug Activity: Cell-based assay /[redacted]-14-061-255 and [redacted]-14-061-251

Dose (mg/kg):	0 (Control)	0.02	0.10	0.25
F_0 females				
No. Evaluated	4	3	4	4
No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0
Tirzepatide Concentrations (ng/mL) ± SD				
GD 6 12 hours postdose	BQL	70.9 ± 8.61	359 ± 14.9	668 ± 362
LD 18 12 hours postdose	BQL	77.9 ± 19.1	326 ± 59.8	1080 ± 282
Drug Activity[a]	NA	3/3	4/4	4/4

(continued)

Table 2.6.7.14–1. Pre- and Postnatal Development Study in Rats (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.10	0.25
F_0 females	Main Study:				
	No. Evaluated	25	25	25	25
	No. Pregnant	24	23	22	25
	No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0
	No. with Total Litter Loss	0	1	0	0
	Clinical observations				
	Pale feces				
	Animals with the finding	0	13	16	21
	Total number of occurrences	0	26	27	87
	Decreased defecation				
	Animals with the finding	0	1	5	6
	Total number of occurrences	0	2	6	9
	Thin				
	Animals with the finding	0	0	15	21
	Total number of occurrences	0	0	29	56
	Necropsy observations	–	–	–	–
	Body weight (g), Gestation Day 20 (% change)[b]	369	↓1.6	↓4.3*	↓7.3**
	Body weight (g) Lactation Day 14 (% change)[b]	321	↓0.31	↓6.5**	↓9.0**
	Body weight (g) Lactation Day 18 (% change)[b]	313	↑0.64	↓3.2	↓5.4**
	Body weight (g), Lactation Day 21 (% change)[b]	308	↑1.3	↓1.3	↓2.3
	Body weight gain (g) Lactation Day 14-18	-8	-5	4**	5**
	Body weight gain (g) Lactation Day 18-21	-5	-3	0	5 **
	Food consumption (g/rat/day), GD 6-20 (% change)[b]	22	↓9.1*	↓18.2**	↓22.7**
	Food consumption (g/rat/day), LD 1-21 (% change)[b]	50	↓2.0	↓14**	↓22**
	Mean duration of gestation (days)	21.6	21.7	21.9	21.7
	Abnormal parturition	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.14–1. Pre- and Postnatal Development Study in Rats (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.10	0.25
F_1 litters	# of litters evaluated	24	23	22	25
Preweaning	Mean # of implantations	13.5	12.9	14.0	12.7
	Mean # pups/litter	12.3	11.6	12.4	11.8
	Mean # liveborn pups/litter	12.1	11.5	12.3	11.8
	# of litters with stillborn pups	–	–	–	–
	Postnatal survival to Day 4	96.2	94.2	99.0	99.1
	Postnatal survival to weaning (after cull)	100	98.9	100	100
	Pup body weight (g), (% change)[b]				
	Males				
	PND 1	7.6	↑1.3	↑1.3	↓9.2**
	PND 4	11.4	↑0.9	↓0.9	↓6.1
	PND 7	17.9	0	↓5.6	↓12.8**
	PND 10	24.7	↓0.4	↓8.9*	↓18.2**
	PND 14	34.3	↑1.5	↓9.3*	↓19.2**
	PND 21	54.7	↑1.5	↓4.8	↓14.1**
	Females				
	PND 1	7.3	0	↓1.4	↓6.8
	PND 4	10.9	↑1.8	0	↓4.6
	PND 7	17.1	↑1.8	↓4.7	↓10.5**
	PND 10	23.7	↑1.3	↓8.0	↓16.0**
	PND 14	33.1	↑2.1	↓7.6	↓16.6**
	PND 21	52.0	↑3.8	↓1.7	↓10.2**
	Pup body weight gains (g)				
	Males				
	PND 10-14	9.6	10.2	8.7	7.5**
	Females				
	PND 10-14	9.4	9.9	8.9	7.7**
	Pup sex ratio on Day 1 (% males)	42.2	53.3	53.6	51.5
	Pup clinical observations	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.14–1. Pre- and Postnatal Development Study in Rats (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.10	0.25
F_1 males	# evaluated per litter	24	22	22	24
Postweaning	# died or euthanized moribund	0	0	0	0
	Clinical observations	–	–	–	–
	Body weight (g) (premating period) (% change)[b]				
	PND 21	54	↑1.9	↓5.6	↓13.0**
	PND 28	99	↑2.0	↓5.1	↓11.1**
	PND 35	161	↑0.6	↓5.6	↓10.6**
	PND 42	227	↓0.4	↓5.3	↓10.1**
	PND 49	293	↓1.0	↓5.5*	↓9.9**
	PND 56	357	↓1.7	↓5.3*	↓9.2**
	PND 63	397	↓1.5	↓5.3	↓10.1**
	PND 70	444	↓0.5	↓4.3	↓9.5**
	PND 77	451	↓0.4	↓4.0	↓9.1**
	PND 84	484	↓1.2	↓4.3	↓9.7**
	PND 91	512	↓1.6	↓3.9	↓9.4**
	Body weight change, PND 21-91 (premating period) (% change)[b]	457	↓1.8	↓3.7	↓8.8**
	Preputial separation (day of attainment)	45.7	45.6	45.7	46.6
	Startle Response	–	–	–	–
	Motor Activity	–	–	–	–
	Learning and Memory	–	–	–	–
	Mean # days prior to mating	2.2	2.7	2.6	2.8
	Male Mating Index (%)	95.8	100	90.9	87.5
	Male Fertility Index (%)	87.5	100	86.4	79.4
	Male Copulation Index (%)	91.3	100	95.0	90.5
	Sperm Evaluation Parameters	–	–	–	–
	Necropsy observations	–	–	–	–
	Organ Weights				

(continued)

Table 2.6.7.14–1. Pre- and Postnatal Development Study in Rats (Continued)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.10	0.25
F_1 males	Number Examined	24	22	22	24
Postweaning	Cauda Epididymis, Left (g)	0.3158	0.3032	0.2930	0.2695**
(continued)	Cauda Epididymis, Right (g)	0.2969	0.2942	0.2840	0.2660**
	Epididymis, Left (g)	0.74	0.70	0.71	0.63**
	Epididymis, Right (g)	0.74	0.75	0.70	0.64**
	Testis, Left (g)	1.99	2.00	1.82*	1.66**
	Testis, Right (g)	2.00	2.02	1.82**	1.69**
F_1 females	# evaluated per litter	24	22	21	25
Postweaning	# died or euthanized moribund	0	0	0	1[c]
	Clinical observations	–	–	–	–
	Body weight (g) (premating period) (% change)[b]				
	PND 21	53	↑1.9	↓3.8	↓11.3**
	PND 28	91	↑1.1	↓2.2	↓8.8**
	PND 35	137	↓0.7	↓3.6	↓8.8**
	PND 42	173	↓1.2	↓2.9	↓7.5**
	PND 49	199	↓0.5	↓2.0	↓6.5*
	PND 56	223	0	↓0.4	↓6.3*
	PND 63	233	↑0.9	↓1.7	↓3.0
	PND 70	255	↑0.8	↓2.4	↓3.5
	PND 77	262	↑1.1	↓3.4	↓2.7
	PND 84	275	↑0.4	↓3.3	↓3.3
	PND 91	282	↑2.5	↓2.5	↓3.9
	Body weight change PND 21-91 (premating period) (% change)[b]	229	↑2.6	↓1.7	↓2.2
	Gestation body weight change GD 0-15 (% change)[b]	71	↑7.0	↑1.4	↑4.2
	Vaginal opening (day of attainment)	32.9	33.9	33.2	33.7
	Startle Response	–	–	–	–
	Motor Activity	–	–	–	–
	Learning and Memory	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.14–1. Pre- and Postnatal Development Study in Rats (Concluded)

	Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.02	0.10	0.25
F_1 females	Female Mating Index (%)	100.0	100.0	100.0	92.0
Postweaning	Female Fertility Index (%)	91.7	100.0	95.2	84.0
(continued)	Female Conception Index (%)	91.7	100.0	95.2	91.3
	Estrous Cycle Length (days)	4.7	4.6	4.4	4.4
	Necropsy Observations	–	–	–	–
	Organ Weights	–	–	–	–
F_2 litters	Mean No. of Corpora Lutea	17.6	17.0	16.5	17.4
	Mean No. of Implantation Sites	15.9	16.0	14.8	15.8
	Mean % Pre-implantation Loss	9.0	5.8	10.5	8.6

Abbreviations: – = no important findings; # = number; ↑ = increase; ↓ = decrease; BQL = below quantitation limit; GD = gestation day; LD = lactation day; NA = not applicable.

[a] Number of animals with active tirzepatide detected at end of administration (LD 18)/total number of animals.

[b] 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).

[c] Not tirzepatide related. One 0.25 mg/kg group F_1 female was found dead on PND 29. No clinical observations or noteworthy changes in body weight were noted prior to death, and no notable gross findings were observed.

*p≤.05, **p≤.01 (using Dunnett's test).

2.6.7.15. Studies in Juvenile Animals

Table 2.6.7.15–1. Juvenile Toxicity Study in Rats

Report Title: A Subcutaneous Injection Juvenile Toxicity Study in Sprague Dawley Rats Administered LY3298176 Every Three Days from Postnatal Day 21 through 84
Species/Strain: Rat/Crl:CD(SD) | Duration of Dosing: PND 21-84 | Document ID: 00353469
Initial Age: 21 Days | Duration of Recovery: PND 87-104 | GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: [redacted]20[redacted] | Method of Administration: subcutaneous injection | Test Article: Tirzepatide
NOAEL: Systemic Toxicity: 0 15 mg kg
Reproductive, Neurobehavioral, and Developmental Toxicity: 1.5 mg/kg
Vehicle/Formulation: 10 mM tris buffer, 150 mM sodium chloride (NaCl), and 0.02% Polysorbate 80, pH 7 ± 0.2 /solution
Litters Culled/Not Culled: Culled
Special features: Drug Activity

Composite Toxicokinetics

Sample: Plasma	Analyte: Tirzepatide	Number of animals: 3sex/group/time point		
Feeding condition: Fed	Dose frequency: Every 3 days from PND 21 to 84	Assay/Method: HRAM LC/MS / 140498VKM_EII_R1 Drug Activity: Cell-based assay / [redacted]-14-061-255 and [redacted]-14-061-251		
Dose (mg/kg)		0.15	0.5	1.5
Males				
PND 21				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)		9560	38600	113000
SE $AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)		327	3060	8960
C_{max} (ng/mL)		373	1470	4760
SD C_{max} (ng/mL)		55.5	389	1320
T_{max} (hr)		12	12	4
PND 84				
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)		7740	48500	145000
SE $AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)		525	2100	12400
C_{max} (ng/mL)		419	1740	5130
SD C_{max} (ng/mL)		57.5	289	2010
T_{max} (hr)		12	12	12
Drug Activity[a]		3/3	3/3	3/3

(continued)

Table 2.6.7.15–1. Juvenile Toxicity Study in Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0.15	0.5	1.5
Females			
PND 21			
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	8700	44800	94000
SE $AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	437	2070	13200
C_{max} (ng/mL)	315	1680	3790
SD C_{max} (ng/mL)	55.9	287	1120
T_{max} (hr)	4	12	4
PND 84			
$AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	11300	46000	133000
SE $AUC_{0\text{-last}}$ (ng•hr/mL)	708	2650	10400
C_{max} (ng/mL)	412	1580	5330
SD C_{max} (ng/mL)	114	410	696
T_{max} (hr)	12	12	12
Drug Activity[a]	3/3	3/3	3/3

(continued)

Table 2.6.7.15–1. Juvenile Toxicity Study in Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.15	0.5	1.5
Males (Dosing Period)				
No. Evaluated[d]	40	40	40	40
No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Body weight g (%)[b]				
PND 21	57	0	0	0
PND 42	226	↓7.1**	↓11.1**	↓19.5**
PND 63	396	↓4.5*	↓9.8**	↓16.4**
PND 84	492	↓6.5**	↓11.2**	↓16.9**
PND 86	501	↓8.2**	↓14.0**	↓20.2**
Body weight gain g (%)[b]				
PND 21-86	444	↓9.2**	↓15.8**	↓23.0**
Food consumption (g/rat/day) (% change)[b]				
PND 21-24	8	↓25**	↓50**	↓62.5**
PND 42-45	25	↓8.0	↓12.0*	↓28.0**
PND 63-66	29	↓3.4	↓6.9**	↓13.8**
PND 84-86	30	↓20.0**	↓30.0**	↓33.3**
Mean Age at Preputial Separation (days)	43.8	45.6	47.4*	49.1**
Hematology	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–
Serum Chemistry	–	–	–	–
Necropsy Observations	–	–	–	–
Organ Weights Absolute, g (%)[b]				
Brain	2.20	↓4.1	↓3.2	↓4.5
Epididymides	1.26	↓4.8	↓4.0	↓7.1
Heart	1.81	↓8.8	↓13.8**	↓16.0**
Seminal Vesicle/coagulation gland	1.98	↓9.6	↓15.7**	↓19.7**
Kidney	3.75	↓2.9	↓5.6	↓11.2**
Liver	17.22	↓6.7	↓11.4	↓15.8**

(continued)

Table 2.6.7.15–1. Juvenile Toxicity Study in Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.15	0.5	1.5
Males (Dosing Period, continued)				
Histopathology				
Skin[c]	10	10	10	10
Atrophy, Adipose Tissue	0	5	6	8
Minimal	–	5	4	4
Mild	–	0	1	2
Moderate	–	0	1	2
Males (Recovery Period)				
No. Evaluated[d]	30	30	30	30
No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Body weight g (%)[b]				
PND 87	497	↓6.8*	↓11.1**	↓17.1**
PND 104	543	↓2.8	↓5.5	↓9.0**
PND 125	582	↓1.5	↓4.8	↓7.4
PND 146	623	0	↓3.9	↓5.9
Body weight Gain g (%)[b]				
PND 87-104	46	↑41.3**	↑56.5**	↑78.3**
PND 87-125	86	↑24.4**	↑31.4**	↑41.9**
PND 87-146	127	↑23.6**	↑24.4**	↑33.1**
Food consumption (g/rat/day) (% change)[b]				
PND 87-91	27	↑11.1*	↑14.8**	↑22.2**
PND 104-108	25	↑4.0	0	↑4.0
PND 115-118	28	↓3.6	↓7.1	↓3.6
PND 122-125	29	0	↓6.9	↓3.4
Reproductive Performance	–	–	–	–
Sperm Evaluation	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–
Serum Chemistry	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.15–1. Juvenile Toxicity Study in Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.15	0.5	1.5
Males (Recovery Period, continued)				
Necropsy Observations				
Recovery Necropsy (PND 105)	–	–	–	–
Organ Weights Absolute, g (%)[b]				
Kidney	4.07	↓3.9	↓6.9	↓13.5*
Reproductive Phase	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–
Females (Dosing Period)				
No. Evaluated[d]	40	40	40	40
No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Body Weight g (%)[b]				
PND 21	56	0	0	0
PND 42	172	↓2.3	↓5.2*	↓5.8*
PND 63	242	↓2.9	↓2.9	↓1.7
PND 84	280	↓5.0*	↓4.3*	↓3.2
PND 86	283	↓7.1**	↓7.8**	↓6.7**
Body weight Gain g (%)[b]				
PND 21-86	227	↓8.8**	↓9.7**	↓8.4**
Food consumption (g/rat/day) (% change)[b]				
PND 21-24	8	↓25**	↓50**	↓62.5**
PND 42-45	17	↓5.9	↓5.9	0
PND 63-66	19	↓10.5**	↓10.5**	↓5.3*
PND 84-86	19	↓26.3**	↓21.1**	↓21.1**
Mean Age at Vaginal Patency (days)	33.6	35.9	38.2**	40.2**
Hematology	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–
Serum Chemistry	–	–	–	–
Necropsy Observations	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.15–1. Juvenile Toxicity Study in Rats (Continued)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.15	0.5	1.5
Females (Dosing Period, continued)				
Histopathology				
Skin[c]	10	10	10	10
Atrophy, Adipose Tissue	0	6	8	9
Minimal	–	6	7	6
Mild	–	0	1	3
Females (Recovery Period)				
No. Evaluated [d]	30	30	30	30
No. Died or Euthanized in Extremis	0	0	0	0
Clinical Observations	–	–	–	–
Body Weight g (%)[b]				
PND 87	283	↓7.4**	↓6.0**	↓5.3*
PND 104	299	↓6.4**	↓4.3	↓3.7
PND 125	310	↓4.8	↓3.5	↓3.2
Body weight Gain g (%)[b]				
PND 87-104	16	↑12.5	↑25.0	↑18.8
PND 87-125	28	↑17.9	↑21.4	↑3.6
Food consumption (g/rat/day) (% change)[b]				
PND 87-91	18	↑11.1	↑16.7**	↑27.8**
PND 104-108	16	↑6.3	0	0
PND 115-118	18	0	0	0
PND 122-125	18	↑11.1	↓5.6	0
Reproductive Performance	–	–	–	–
Estrous Evaluation	–	–	–	–
Hematology	–	–	–	–
Coagulation	–	–	–	–
Serum Chemistry	–	–	–	–

(continued)

Table 2.6.7.15–1. Juvenile Toxicity Study in Rats (Concluded)

Dose (mg/kg)	0 (Control)	0.15	0.5	1.5
Females (Recovery Period, continued)				
Necropsy Observations	–	–	–	–
Recovery Necropsy (PND 105)	–	–	–	–
Reproductive Phase	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–
Histopathology	–	–	–	–
Mean No. of Corpora Lutea	16.5	16.1	17.3	17.6
Mean No. of Implantations	15.6	15.1	15.8	16.3
Mean Pre-implantation Loss	0.9	1.0	1.5	1.3

Abbreviations: – = no important findings; # = number; ↑ = increase; ↓ = decrease; AUC = area under the plasma concentration-time curve; C_{max} = maximum plasma concentration; NA = not applicable; PND = Postnatal Day; SD = standard deviation; SE = standard error; T_{max} = time to maximum concentration**.**

[a] Number of animals with active tirzepatide detected at end of administration (PND 84)/total number of animals.

[b] 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).

[c] Number of tissues examined from each group.

[d] Number evaluated for reproductive parameters, PND 125 BW, PND 104 food consumption and reproductive phase postmortem evaluation -(n=20). Number evaluated for clinical pathology and postmortem evaluation (n=10).

*p≤.05, **p≤.01 (using Dunnett's test).

2.6.7.16. Local Tolerance

Not applicable.

2.6.7.17. Other Toxicity Studies

Table 2.6.7.17–1. Other Toxicity Studies

Species, Strain	Route	Duration of Dosing	Doses (mg/kg)	#/Sex/Group	Noteworthy Findings	Document ID
Studies on Impurities						
Rat, Sprague Dawley	SC	2 weeks	0, 3	10	3 mg/kg (M & F): ↓ BW; ↓F C; ↓ mean corpuscular volume; ↓ total protein concentration; ↑ alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) activities; atrophy of adipocytes in the subcutis of the skin; lymphocyte necrosis or decreased cortical lymphocytes in the thymus 3 mg/kg (M): ↓ reticulocyte and neutrophil counts; ↓ red cell distribution width; ↓ glucose and triglyceride concentrations; decreased zymogen granules in the pancreas 3 mg/kg (F): thin appearance; ↓ red cell mass (red blood cell count, hemoglobin, hematocrit); ↓ calcium concentration; ↑ urea nitrogen and phosphorus concentrations	8394210
Rat, Sprague Dawley	SC	2 weeks	0, 3[a], 3[b]	10	3 mg/kg (M & F; both lots): thin appearance; piloerection; ↓ BW; ↓ FC; ↓ red cell mass; ↓ mean corpuscular volume; ↓ reticulocyte count; ↓ triglyceride concentration; atrophy of adipocytes in the subcutis of the skin and injection sites; thymic lymphocyte apoptosis 3 mg/kg (M; both lots): atrophy of mammary glands 3 mg/kg (F; both lots): ↓ red cell distribution width; ↓ albumin, total protein and calcium concentrations	8420235

Abbreviations: # = number; ↓ = decreased; ↑ = increased; BW = body weight; F = females; FC = food consumption; M = males; SC = subcutaneous.

[a] Lot [redacted] (Lot A).

[b] Lot [redacted] (Lot B).