

表1 日米欧で承認されているバイオ後続品/biosimilars

蛋白質	日本		米国		欧州	
	先行品 名(開発会社)	製品 バイオ後続品 製品名(開発会社)	先行品 名(開発会社)	製品 biosimilar 製品 名(開発会社)	先行品 名(開発会社)	製品 biosimilar 製品名(開発会社)
成長ホル モン	ジェノトロピ ン [®] (ファイ ザー)	ソマトロピン BS 皮下注「サンド」 (サンド)	Genotropin [®] (Pharmacia and Upjohn)	Omnitrope [®] (Sandoz)	Genotropin [®] (Pfizer)	Omnitrope [®] (Sandoz)
	—	—	Humatrope [®] (Eli Lilly)	Valtropin [®] (LG Life)	Humatrope [®] (Eli Lilly)	Valtropin [®] (BioPartners)
エリスロ ポエチン	エスポー [®] (協和発酵キ リン)	エポエチンアル ファ BS 注「JCR」 (日本ケミカルリ サーチ)	—	—	Eprex [®] / Erypo [®] (Janssen- cilag)	Silapo [®] (Stada Arzneimittel) Retacrit [®] (Hospira) Abseamed [®] (Medice Arzneimittel) Binocrit [®] (Sandoz) Epoerin alfa Hexal [®] (Hexal Biotech)
顆粒球コ ロニー刺 激因子	—	開発コード: FSK0808*1 2011年12月申請 開発コード: TKN732*2 2012年3月申請	—	—	Neupogen [®] (Amgen)	Tevagrastim [®] (Teva Generics) Ratiograstim [®] (Ratiopharm) Biograstim [®] (CT Arzneimittel) Zarzio [®] (Sandoz) Filgrastim Hexal [®] (Hexal) Nivestim [®] (Hospira)

*1: 富士製薬工業および持田製薬

*2: 興和テバ, 大洋薬品工業および日本化薬
「透析療法ネクスト XI」より改変

医薬品, 並びに3品目の抗体関連医薬品 (Fc 融合蛋白質医薬品) が上市されている (表2). 抗体医薬品の多くは, 免疫調節薬あるいは抗腫瘍薬であり, 免疫機能にかかわるヒト蛋白質や腫瘍細胞に存在するヒト蛋白質を抗原とするモノクローナル抗体を作製して⁷⁾, 医薬品として用いているものである. 日本では2001年以降, 遺伝子組換え技術を応用して製造された抗体医薬品の承認が増加しており, 最近では, バイオ医薬品の中では, 抗体医薬品が最も承認品目の多い製品群となっている⁸⁾.

抗体は, 本来, 感染防御にかかわる液性免疫を担う生体内蛋白質であり, ヒト血漿から精製されたヒト免疫グロブリン製剤は, 現在でも, 麻疹, 肝炎, ポリオ, 破傷風, あるいは重症感染症における抗生物質との併用等を効能・効果として用いられている. 一方で, 承認されているモノクローナル抗体医薬品で唯一, 感染症を対象としたものは, 抗RSウイルス (respiratory syncytial virus) F蛋白質を標的分子とするシナジス[®] (パリピズマブ) であり, 新生児, 乳児および幼児に

おけるRSウイルス感染による重篤な下気道疾患の発症抑制に用いられる. 実用化には至っていないが, 日本ではヒトリンパ球からヒトモノクローナル抗体を取得する新たな技術が開発されており^{9~11)}, B型肝炎ウイルスに対する抗体等の作製例が報告されている.

Fc融合蛋白質医薬品は, IgGのFc領域を受容体細胞外領域等の生理活性蛋白質と融合させた人工蛋白質を有効成分とする医薬品であり, 標的分子への特異的結合を持つこと, Fc領域により血中安定性が確保されていることといった点で, 抗体と類似した性質を持つ¹²⁾. 例えば, エタネルセプトは, TNF受容体の細胞外領域とIgG由来Fc領域の融合蛋白質であり, TNFに結合することにより生体内でTNFの作用を抑制するため, 抗TNF抗体と同様に関節リウマチの治療薬として用いられている.

■抗体医薬品のバイオ後続品

抗体医薬品類の各効能・効果における再審査期間および再審査期間終了時を表2に記載した. 抗

体医薬品類は希少疾病医薬品として開発される例が多く、再審査期間が10年と定められている製品が多い。初回承認後、新効能医薬品として承認申請され、効能・効果が追加されるケースもあり、その際には、追加される効能・効果についても再審査期間が設定される。抗TNF抗体であるレミケード®（インフリキシマブ）の再審査期間が、効能・効果により異なっているのは、そのためである。効能・効果の追加の際、すでに承認された効能・効果に関する再審査期間の残余期間が、新たな効能・効果に関する再審査期間とされることもある。アバスタチン®（ペバシズマブ）等がその例である。ハーセプチン®（トラスツズマブ）、リツキサン®（リツキシマブ）、シムレクト®（バシリキシマブ）、シナジス®ではすでに再審査期間が終了し、レミケード®については、一部の効能・効果について再審査期間が終了している。

表3は、欧州および米国別に、世界の医薬品市場で売上上位を占める大型バイオ医薬品が特許期間の満了を迎える時期をまとめたものである。Herceptin®, Synagis®, Erbitux®, Enbrel®, Humira®, Remicade® および Rituxan® の特許が、欧州または米国において数年以内に切れることが示されている（日本では関連製品がそれぞれハーセプチン®, シナジス®, アービタックス®, エンブレル®, ヒュミラ®, レミケード® およびリツキサン® として販売されている）。実際、2012年4月 Cellrion 社は、欧州医薬品庁（EMA）に、Remicade® の biosimilar の製造販売承認申請を行っている。Infliximab は、キメラ型抗ヒトTNF- α 抗体であり、関節リウマチ治療薬として用いられている。ヨーロッパでは1999年に承認され、2014年8月に特許が切れることになっている。これまでに申請された抗体医薬品のバイオ後続品/biosimilars は、現在のところ Remicade® の後続品のみであるが、報道や各社のプレス発表の状況から、今後数年の間に、抗体医薬品バイオ後続品の申請が増えるものと予想される。

各国の規制当局も、バイオ後続品/biosimilars

申請・審査のためのガイドライン作成や制度作りを進めている。これまで、EMA が先導的にガイドライン整備を進め、2005年以降、総論的ガイドラインに加えて、非臨床・臨床試験に関する製品群別のガイドラインを継続的に公表している。EMA の製品群別ガイドラインには、抗体医薬品に関するものも含まれ、2012年5月に最終版が公表された¹³⁾。このガイドラインの中では、段階的アプローチ（stepwise approach）による同等性/同質性評価が推奨され、非臨床試験では、*in vitro* 試験の結果に基づいて *in vivo* 試験の必要性や規模を決めること、臨床試験では、まず、PK および PD の比較試験を行うこと、PD の比較による判断が難しい場合には、有効性の比較を行うこと等が示されている。腫瘍効果を持つ抗体医薬品 biosimilar の臨床試験では、先行品については生存期間の延長など、患者にとってのベネフィットがすでに確認されていることを踏まえ、先行品と biosimilar の特性の違いを検出しやすい方法として、均一な患者集団を対象とし、腫瘍体積の変化等を指標とすることも考慮できるなど、biosimilar の臨床評価に特有と思われる考え方も示されている。2009年にはWHO、2010年にはカナダでもガイドラインが公表されている。米国では、2012年2月に企業に向けたドラフトガイダンスが公開されており、今後 biosimilar 開発が加速することが予想される。日本では2009年にバイオ後続品承認申請のための新たな区分が設けられ、同時に「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」が通知として発出されており、バイオ後続品の承認申請を受け入れる体制は整っている。

我が国ではバイオ後続品に関する薬価算出ルールも整備されている。現在の薬価算定のルールでは、同じ効果を持つ類似薬がある場合には、市場での公正な競争を確保する観点から、新薬の1日薬価を既存類似薬の1日薬価に合わせるようになっていたが、バイオ後続品が新たに承認され、薬価収載される場合は、後発医薬品と同様に、先行

表2 日本で承認されている抗体医薬品およびFc融合蛋白質医薬品

抗体医薬品

製品承認年	製品名	一般名	標的分子	効能効果の概略	再審査期間	再審査期間終了
1991年	オルソクロン [®] OKT [®] 3注	ムロモナブ-CD3	CD3	腎移植後の急性拒絶反応	10年	2001年3月
2001年	ハーセプチン [®] 注射用	トラスツズマブ	HER2	HER2 過剰発現転移性乳癌 HER2 過剰発現乳癌における術後補助化学療法 (残余期間) HER2 過剰発現進行・再発の胃癌 (残余期間)	10年	2011年4月 2011年4月 2011年4月
2001年	リツキシマン [®] 注	リツキシマブ	CD20	B細胞性非ホジキンリンパ腫	10年	2011年6月
2002年	レミケード [®] 点滴静注用	インフリキシマブ	TNF- α	クローン病 関節リウマチ 関節リウマチ投与量増量・投与間隔短縮 ペーチェット病による難治性網膜ぶどう膜炎 乾癬 強直性脊椎炎 潰瘍性大腸炎	10年 5年10カ月 4年 10年 4年 10年 1年7カ月	2012年1月 2009年5月 2013年7月 2017年1月 2014年1月 2020年4月 2012年1月
2002年	シムレクト [®] 静注用	バシリキシマブ	CD25	腎移植後の急性拒絶反応	10年	2012年1月
2002年	シナジス [®] 筋注用	バリビズマブ	RSV F protein	RSウイルス感染	8年	2010年1月
2005年	マイロテグ [®] 点滴静注用	ゲムツズマブ オゾガマイシン	CD33	CD33陽性の急性骨髄性白血病	10年	2015年7月
2005年	アクテムラ [®] 点滴静注用	トリシズマブ	IL-6R	キャッスルマン病 関節リウマチ 若年性突発性関節炎	10年 5年10カ月 5年10カ月	2015年4月 2014年2月 2014年2月
2007年	アバスタチン [®] 点滴静注用	ベバシズマブ	VEGF	結腸・直腸癌 非小細胞肺癌 乳癌	8年 (残余期間) (残余期間)	2015年4月 2015年4月 2015年4月
2008年	ゼヴァリン [®] イットリウム (⁹⁰ Y) 静注用セット	イブリツモマブ チウキセタン	CD20	CD20陽性のB細胞性非ホジキンリンパ腫	10年	2018年1月
	ゼヴァリン [®] インジウム (¹¹¹ In) 静注用セット	イブリツモマブ チウキセタン	CD20	イブリツモマブ チウキセタンの集積部位の確認	10年	2018年1月
2008年	アービタックス [®] 注射液	セツキシマブ	EGFR	EGFR陽性の結腸・直腸癌	8年	2016年7月
2008年	ヒュミラ [®] 皮下注	アダリムマブ	TNF- α	関節リウマチ	8年	2016年4月
2009年	ゾレア [®] 皮下注用	オマリズマブ	IgE	気管支喘息	8年	2017年1月
2009年	ルセンチス [®] 硝子体内注射液	ラニビズマブ	VEGF-A	加齢黄斑変性症	10年	2019年1月
2010年	ベクティビックス [®] 点滴静注	パニツムマブ	EGFR	KRAS遺伝子野生型の結腸・直腸癌	8年	2018年4月
2010年	ソリリス [®] 点滴静注	エクリズマブ	C5	発作性夜間血色素尿症	10年	2020年4月
2011年	シンボニー [®] 皮下注	ゴリムマブ	TNF- α	関節リウマチ	8年	2019年6月
2011年	ステラーラ [®] 皮下注	ウステキヌマブ	IL-12, IL-23 p40	乾癬	8年	2019年1月
2011年	イラリス [®] 皮下注用	カナキヌマブ	IL-1 β	クリオピリン関連周期性症候群	10年	2021年9月
2012年	ランマーク [®] 皮下注	デノスマブ	RANKL	多発性骨髄腫/固形癌骨転移による骨病変	8年	2020年1月
2012年	ボテリジオ [®] 点滴静注	モガムリズマブ	CCR4	CCR4陽性成人T細胞白血病リンパ腫	10年	2022年3月

Fc融合蛋白質医薬品

製品承認年	製品名	一般名	標的分子	効能効果の概略	再審査期間	再審査期間終了
2005年	エンブレル [®] 皮下注用	エタネルセプト	TNF- α , LT α	関節リウマチ 関節リウマチ用法・用量の追加 若年性突発性関節炎	8年 3年 4年	2013年1月 2013年1月 2013年7月
2010年	オレンシア [®] 点滴静注用	アバタセプト	CD80/CD86	関節リウマチ	8年	2018年7月
2011年	ロミブレート [®] 皮下注	ロミプロスチム	TPOR	慢性突発性血小板減少性紫斑病	10年	2021年1月

表3 大型バイオ医薬品の特許満了時期

バイオ医薬品製品	一般名	特許期間満了		日本での関連製品
		欧州	米国	
Avastin [®]	bevacizumab	2022. 1. 12	2019. 2. 26	アバスタチン [®]
Herceptin [®]	trastuzumab	2014. 7. 28	2019. 6. 18	ハーセプチン [®]
Synagis [®]	palivizumab	2015. 8. 9	2015. 10. 20	シナジス [®]
Erbix [®]	cetuximab	2014. 6. 29	2016. 2. 13	アービタックス [®]
Enbrel [®]	etanercept	2015. 2. 1	2028. 11. 22	エンブレル [®]
Humira [®]	adalimumab	2018. 4. 16	2016. 12. 31	ヒュミラ [®]
Remicade [®]	infliximab	2014. 8. 13	2018. 9. 4	レミケード [®]
Rituxan [®]	rituximab	2013. 11. 12	2016. 9. 22	リツキサン [®]
Aranesp [®]	darbepoetin alfa	2016. 7. 6	2024. 5. 15	ネスプ [®]
Epogen [®]	epoetin alfa	expired	2013. 8. 20	エスポー [®]
Neulasta [®]	pegfilgrastim	2017. 8. 21	2015. 10. 20	なし
Neupogen [®]	filgrastim	expired	2013. 12. 3	ゲラン [®]

GaBi Online より改変

バイオ医薬品の0.7倍の薬価が基本となると定められた。ただし、有効性等に関する臨床試験を実施した実績等を踏まえて10%までの上乘せが認められる可能性があるため、現在のルールであれば、先発医薬品の70~77%の薬価になる。抗体医薬品は開発コストが高いこと、1回の投与量が多いことから、患者の経済的負担は大きくなる傾向があり、関節リウマチやある種の癌では、年間薬剤費が数百万円単位となることがあるといわれている。抗体医薬品のバイオ後続品の普及は、患者にとっても、経済的負担軽減の一助になると期待されている。

文 献

- 1) バイオ後続品の品質・有効性・安全性確保のための指針。薬食審査発第0304007号、平成21年3月4日
- 2) バイオ後続品の承認申請について。薬食発第0304004号、平成21年3月4日
- 3) バイオ後続品の承認申請に際し留意すべき事項について。薬食審査発第0304015号、平成21年3月4日
- 4) バイオ後続品に係る一般的名称及び販売名の取扱いについて。薬食審査発第0304011号、平成21年3月4日
- 5) 「バイオ後続品の品質・有効性・安全性確保のための指針」(案)に関する意見公募に対して寄せられた御意見について。厚生労働省医薬食品局審査管理課、平成21年3月4日
- 6) 生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源

- 由来医薬品)の製造工程の変更にもなう同等性/同質性評価について。薬食審査発第0426001号、平成17年4月26日
- 7) Lonberg N: Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23: 1117-1125, 2005.
 - 8) 我が国で承認されたバイオ医薬品(国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部ホームページ)
http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html
 - 9) Kishi H, Jin A, Ozawa T *et al.*: Screening of antigen-specific antibody-secreting cells. *Methods Mol Biol* 853: 141-150, 2012.
 - 10) Jin A, Ozawa T, Tajiri K *et al.*: A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Nat Med* 15: 1088-1092, 2009.
 - 11) Matsumoto T, Yamada K, Noguchi K *et al.*: Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus. *Microbiol Immunol* 54: 673-683, 2010.
 - 12) Beck A, Reichert JM: Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies. *MAbs* 3: 415-416, 2011.
 - 13) Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies-non-clinical and clinical issues. 30 May 2012. EMA/CHMP/BMWP/403543/2010
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128686.pdf

バイオ後続品

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

川崎 ナナ Nana KAWASAKI 石井 明子 Akiko ISHII

はじめに

遺伝子組換えインスリン類やインターフェロン類に代表されるように、バイオ医薬品は様々な疾患において標準的治療薬として認められるようになってきた。また、リウマチやある種のがん治療などでも、新たな治療薬として抗体医薬品等への注目や期待は高まっており、新有効成分含有医薬品に占めるバイオ医薬品の割合は年々増加している。一方で、薬価が高いバイオ医薬品の普及は、患者への経済的負担の増大にもつながっており、マスコミ等でも報じられているように、社会的課題として考えられるようになってきた。そのなかで、1990年前後に開発された初期のバイオ医薬品の特許期間・再審査期間が終了し、低コストでの開発が期待できる「バイオ後続品/バイオシミラー」に世界的な注目が集まるようになった。バイオシミラーの製品化は欧州で先行したが、日本でも平成21年3月バイオ後続品に関する一連の通知が発出され、これまでに2製品が上市されている。本稿では、バイオ後続品について、新有効成分含有医薬品、ジェネリック/後発医薬品およびバイオシミラーとの違いを取り上げながら規制要件を整理するとともに、名称、薬価、および現在上市・申請されている製品について概説する。

バイオ後続品とは

平成21年3月、厚生労働省医薬食品局長通知「バイオ後続品の承認申請について」が発出され、医薬品申請における新たな区分としてバイオ後続品が追加された(薬食発第0304004号)(表1)。これにより、バイオ後続品は「既に販売承認を与えられているバイオテクノロジー応用医薬品と同等/同質の医薬品」と定義され、新有効成分含有医薬品やジェネリック医薬品とは区分して取り扱われることとなった。さらに同日、「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」が通知され、我が国におけるバイオ後続品の定義、指針の適用範囲、およびバイオ後続品の品質・安全性・有効性確保に関する考え方などが詳細に示された(薬食審査発第0304007号)(表1)¹⁾。本通知では、前述の0304004号通知より具体的に、バイオ後続品とは、「国内で既に新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品(先行バイオ医薬品)と同等/同質の品質、安全性、有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」のことに定義されている²⁾。

表1 バイオ後続品に関する指針・通知

発出年月日および通知番号	内容
平成21年3月4日 薬食発第0304004号	バイオ後続品の承認申請について
平成21年3月4日 薬食審査発第0304007号	バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針
平成21年3月4日 薬食審査発第0304015号	バイオ後続品の承認申請に際し留意すべき事項について
平成21年3月4日 薬食審査発第0304011号	バイオ後続品に係る一般的名称及び販売名の取扱いについて
平成21年3月4日 厚生労働省医薬食品局審査管理課	「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」(案)に関する意見公募に対して寄せられた御意見について
平成21年7月21日 事務連絡 厚生労働省医薬食品局審査管理課	バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針に関する質疑応答集(Q&A)について
平成22年3月31日 事務連絡 厚生労働省医薬食品局審査管理課	バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針に関する質疑応答集(Q&A)について

新有効成分含有医薬品との違い

新有効成分含有医薬品とは、既承認医薬品および日本薬局方に定められている医薬品のいずれにも有効成分として含有されていない成分を有効成分として含有する医薬品のことである。バイオ医薬品は、遺伝子組換え技術および細胞培養技術を応用して製造される医薬品であり、製造工程を特徴づける要素には、宿主・ベクター系、セルバンクシステム、培養・精製工程、製剤化工程がある。バイオ医薬品が新有効成分含有医薬品として申請承認される場合は、通常、特性解析 ((1)構造・組成, (2)物理的・化学的性質, (3)生物学的性質, (4)免疫化学的性質, (5)不純物 (目的物質由来不純物, 宿主細胞や培養液などに由来する製造工程由来不純物, ウイルス等混入汚染物質など)), 品質管理方法の構築, 安定性評価, 並びに非臨床・臨床試験による安全性・有効性の評価が要求される。現在, ホルモン, 酵素, 血液凝固因子, およびモノクローナル抗体等を中心に, 剤形や容量違いを含めると100を超える品目が医療用医薬品として販売・使用されている³⁾。

バイオ後続品は、先行バイオ医薬品開発メーカーとは異なるメーカーにより、先行バイオ医薬品とは異なる宿主・ベクター、セルバンク、培養・精製工程、および製剤化工程が構築されて製造される。新有効成分開発と同様に、上述の(1)~(5)の特性解析を行ったうえで、さらに、参照品とする先行バイオ医薬品との品質の比較試験、非臨床試験 (薬理作用の比較試験, 毒性試験), および臨床試験 (臨床薬物動態 (以下, PK) 試験, 薬力学 (以下, PD) 試験, PK/PD, 有効性, 安全性の比較試験)}, により同等性/同質性を検証する。PD試験, PK試験, またはPK/PD試験により、目的とする臨床エンドポイントにおける同等性/同質性を保証できる十分なデータが得られた場合には、有効性に関する臨床試験を省略できる場合がある。バイオ後続品の剤形と投与経路は、原則的に先行バイオ医薬品と同一である。製剤中の添加物などバイオ後続品の製剤処方については、有効性・安全性に影響がないことが確認されれば、先行バイオ医薬品と異なってもよい。品質管理手段としての規格および試験法、並びに保存条件と有効期間は、特性解析結果、並びに実保存期間・実保存条件での長期保存試験等に基づいて設定されるので、先行バイオ医薬品と同一とは限らない。

先行バイオ医薬品が日本薬局方収載品目であっても、各条規格とバイオ後続品の規格が一致しないことがある。また、先行バイオ医薬品が複数の効能・効果を有する場合、ある効能・効果において先行バイオ医薬品と有効性が同等/同質であり、ほかの効能・効果においても薬理的に同様の作用が期待できることが説明できるのであれば、対照薬として用いた先行バイオ医薬品が承認を取得しているほかの効能・効果をバイオ後続品に外挿することが可能となる場合がある。ただし、先行バイオ医薬品に含まれていない効能・効果でも、別途臨床試験を実施したうえで追加される可能性がある。

ジェネリック医薬品との違い

ジェネリック/後発品医薬品とは、すでに承認されている医薬品と有効成分、投与経路、用法・用量、効能・効果が同一の医薬品のことであり、主に化学合成医薬品を対象としている。化学合成医薬品は、既存品との有効成分の同一性を理化学的手法等により、比較的容易に検証することができるからである。投与経路は先発医薬品と同一であるが、医療用の必要性および有用性があれば、先発医薬品が有していない剤形および規格違いが認められる。通常、特性解析結果から非臨床試験により毒性を評価すべき不純物が含まれないことが示され、また、生物学的同等性を示すことができれば、非臨床試験・臨床試験による有効性・安全性の確認は必要とされない。生物起源由来医薬品のうち、ヘパリンや低分子ヘパリン製剤などの多糖類の後発品は、ジェネリック医薬品として扱われている。

バイオ後続品がジェネリック医薬品と大きく異なる点は、品質、安全性、有効性において、先行バイオ医薬品との同等性/同質性*を検証することが求められる点である。バイオ医薬品の有効成分は、一般に、分子量が大きく構造が複雑で、かつ分子多様性が存在するために、先行品とバイオ後続品との間で同一性を検証することは容易ではなく、同等性/同質性の検証が要求される。同等性/同質性とは、必ずしも製品の品質特性が全く同じであることを意味するものではなく、製品間の類似性が高いこと、並びに、品質特性に何らかの差異があったとしても、既存の知識から最終製品の安全性や有効性には影響を及ぼさないであろうことが十分に保証できることを意味する。理化学試験、生物活性試験、そして場合に

* : 同等性/同質性に関しては、生物薬品 (バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品) の製造工程の変更にともなう同等性/同質性評価について (平成17年4月26日 薬食審査発第0426001号)⁴⁾に詳しく記載されている。

よっては、非臨床試験データおよび臨床試験データを組み合わせることで判定される。

具体的には、品質面では、新有効成分含有医薬品開発と同程度以上の品質特性解析に加え、先行バイオ医薬品との比較試験が求められる。比較試験の対象は主に、糖タンパク質における糖鎖プロファイルや、目的物質関連物質および目的物質由来不純物のプロファイル、高次構造などである。非臨床試験としては、主に、薬理試験（*in vitro*もしくは*in vivo*での先行バイオ医薬品とバイオ後続品との直接比較）、および毒性試験（主に動物を用いた反復投与毒性試験）が実施される。一般に、品質比較試験および非臨床試験結果のみによって、先行バイオ医薬品との同等性/同質性を検証することは困難であるので、基本的には臨床試験により同等性/同質性が評価される。臨床試験として、PK試験、PD試験、またはPK/PD試験が求められる。これらの結果を合わせても、同等性/同質性の結論が下せない場合は、有効性が同等/同質であることを確認するための臨床試験を行う。臨床試験の目標数は、品質面における比較試験において、どの程度類似性が確認されたかによって決められる。

承認後の臨床での使用にあたってバイオ後続品とジェネリック医薬品で大きく異なる点は、ジェネリック医薬品が先発医薬品の代替品としての使用が認められているのに対して、バイオ後続品では代替が好ましくないとされている点である。「バイオ後続品の品質・安全性・有効性確保のための指針」において、バイオ後続品の場合は、有害事象のトレーサビリティを確保するため、一連の治療期間内での混用や代替は避ける必要があるとされている。

米国では、biosimilarのなかでも、先行品と代替可能であることが認められる製品をinterchangeableな製品として、一般的なbiosimilarと区別して取り扱うと定められている⁵⁾。Interchangeableな製品、すなわち先行品と互換性のある製品として認められるには、一般的なbiosimilarと同様に、先行品と同等/同質であることを示すことに加えて、どのような患者に対しても先行品と同じ臨床的結果をもたらすと期待されること、複数回投与される製品の場合は、先行品からbiosimilarへの変更により生じるリスクが、先行品を使い続ける場合に生じるリスクより大きくないことを示すこと、といった高いハードルが設定されている。これまで、interchangeableな医薬品として承認された製品はなく、具体的にどのようなデータがあればinterchangeableと認められるのかは明確でないが、日本での先行品と後続品の混用・代替については、臨床使用実績が蓄積された後、あらた

めて議論が必要と思われる。

バイオシミラーとの違い

日本、米国、欧州、および世界保健機関（以下、WHO）において、先行品との同等性/同質性が求められるバイオ医薬品の規制上の呼び方は異なっている。欧州では平成15年にDirective 2003/63/ECが、続いて関連ガイドライン⁶⁾が発出されており、そのなかでsimilar biological medicinal productsという承認申請カテゴリーが用いられている。米国では、同様な医薬品に関する規制環境整備が遅れていたが、平成24年2月に業界向けガイダンス案⁷⁾が公開され、そのなかでbiosimilarsが用いられている。また、平成21年に公表されたWHOガイドライン⁸⁾ではsimilar biotherapeutic products (SBPs) が用いられている。このように欧米でbiosimilarが用いられていることもあり、日本国内でもバイオシミラーという呼び方が広まっているようである。しかし、先述したように、日本国内では、規制上はバイオ後続品が正式な呼び名である。

呼び名は異なっても、バイオ後続品も海外のバイオシミラーも、すでに販売承認を与えられているバイオ医薬品と同等/同質の医薬品であるという考え方に相違はない。また、ジェネリック医薬品の要件とは異なり、臨床試験により、PK、PD、有効性および安全性に関して参照品との比較が必要であるという認識も共通している。ただし、適用対象とする製品群、参照品の要件、参照品との同等性/同質性を示すために求められる要件、効能・効果外挿の可能性（参照品が複数の効能・効果をもつ場合、後続品の臨床試験がそのうちの特定の効能・効果に関して行われた場合に、臨床試験を実施していない効能・効果を後続品にも認める可能性）、参照品との互換性あるいは代替に関する考え方に多少の相違がある場合がある。バイオ後続品とバイオシミラーはイコールでないことに留意する。

バイオ後続品の一般的名称

新有効成分にはWHOより国際一般名（International Nonproprietary Name：以下、INN）が与えられる。INNは世界中の誰もが自由に使うことができる世界共通の医薬品の名前で、欧州ではINNで処方される。INNは、原則として化学的に新規と判断された有効成分に対して命名される。バイオ後続品/バイオシミラーは、化学的同一性ではなく、品質・有効性・安全性に関する同等性/

同質性データに基づいて総合的に判断されるものであり、同等/同質か否かの判断は、参照医薬品や各国の規制要件によって変わり得るものである。INN委員会は、基原や構造に関する特性を基に新規か否かの判断はしても、有効性・安全性の評価を含む同等/同質か否かの判断はしない。従って、先行品と異なるINNが付与されていても、各国の規制当局がバイオ後続品/バイオシミラーと判断する場合がある。同様に、同一INNであっても、各国でバイオ後続品/バイオシミラーか新有効成分かの判断が分かれることもあり得る。

日本では、新有効成分には、厚生労働省が一般的名称 (Japanese Accepted Name: 以下, JAN) を定め、審査管理課長通知として発出される。JANはINNとの整合性を最優先として決められるので、JANとINNを介して、新有効成分に関する有効性・安全性情報を世界中で共有することができる。バイオ後続品の一般的名称および販売名は、先行バイオ医薬品、および同一品を先行バイオ医薬品とするほかのバイオ後続品と容易に区別できるようなルールが設けられている (平成21年3月4日付け薬食審査発第0304011号「バイオ後続品に係る一般的名称及び販売名の取扱いについて」(表1)。すなわち、個別品目の承認審査によってバイオ後続品と判断された時点で、バイオ後続品のJANは、先行バイオ医薬品の一般的名称 (遺伝子組換えに係る記載を除く) の末尾に「後続1 (2, 3 …)」を括弧書きで追加したものとなる。例えば、エポエチン アルファ後続品として国内で初めて承認された製品の場合、当初、INNは *epoetin kappa*, JANはエポエチン カッパと定められていたが、後続品として審査されたのち、JANはエポエチン カッパ (遺伝子組換え) [エポエチン アルファ後続1] と変更されている。これは日本独自のルールである。医薬品の使用者が、先行品とバイオ後続品を容易に識別できるようにするために設けられたラベル付けシステムであり、免疫原性等の安全性評価を目的として、市販後安全調査の効率的な実施に寄与している。なお、成長ホルモンやインスリンのように、糖鎖などの修飾構造をもたないタンパク質 (単純タンパク質) を有効成分とする場合は、新たに一般的名称を付すことなく、先行バイオ医薬品の一般的名称とすることとされている。

販売名については、平成17年9月22日付け薬食審査発第0922001号審査管理課長通知に準じ、一般的名称 (名称中の遺伝子組換え等に係る記載は省略し、また、「後続1 (2, 3, …)」の代わりに「BS」と記載) に剤形、含量および会社名 (屋号等) を付すことが原則とされている。

〈例示〉

△△製薬が○○○ (遺伝子組換え) を×× (遺伝子組換え) の後続品として10mg含有注射剤として販売する場合

一般的名称: ○○○ (遺伝子組換え) [××後続1]

販売名: ×× BS 注射液 10mg 「△△」

バイオ後続品の薬価

薬価基準は、医療保険から保険医療機関や保険薬局 (保険医療機関等) に支払われる際の医薬品の価格を定めたものであり、平成22年2月12日に中央社会保険医療協議会がとりまとめた「薬価算定の基準について」に基づき、厚生労働大臣が告示する。薬価基準で定められた価格は、医療機関や薬局に対する実際の販売価格 (市場実勢価格) を調査 (薬価調査) し、その結果に基づき定期的に改定される。現在の薬価算定のルールでは、同じ効果をもつ類似薬がある場合には、市場での公正な競争を確保する観点から、新薬の1日薬価を既存類似薬の1日薬価に合わせる。バイオ後続品が新たに承認され、薬価収載される場合、後発医薬品と同様に、先行バイオ医薬品の0.7倍の薬価が基本となる。ただし、有効性等に関する臨床試験を実施した実績等を踏まえて10%までの上乘せが認められる可能性があるため、現在のルールであれば、先発医薬品の70~77%の薬価になる。バイオ医薬品は非常に高額で、関節リウマチやある種のがんでは、年間薬剤費が数百万円単位となることが問題とされており、バイオ後続品の普及は患者負担の軽減や医療費削減の一助になるものと期待されている。

ソマトロピン後続品

ソマトロピンはヒト成長ホルモンであり、191個のアミノ酸残基からなる分子量約22,000のタンパク質である。ヒト成長ホルモンは、下垂体前葉で産生・分泌され、組織への直接作用および肝臓でのインスリン様成長因子-1の産生を介して、身体の成長促進作用 (軟骨形成促進、タンパク質同化促進等) や体組成改善作用を示す。日本ではソマトロピン製剤として、グロウジェクト® (JCR)、サイゼン® (メルクセローノ)、ジェノロトピン® (ファイザー)、ノルディトロピン® (ノボノルディスクファーマ)、ヒューマトロブ® (日本イーライリリー) およびソマトロピンBS皮下注5mg「サンド」(サンド) ほか販売されている。

ソマトロピンBS皮下注 5 mg「サンド」および同 10mg「サンド」は、ジェノトロピン®を先行品としたバイオ後続品である。単純タンパク質であるので、JANはジェノトロピン®と同じソマトロピンである。国内ではいずれも、骨端線閉鎖を伴わない成長ホルモン分泌不全性低身長症、骨端線閉鎖を伴わない次の疾患における低身長（ターナー症候群、慢性腎不全）、および成人の重症成長ホルモン分泌不全症の治療薬として用いられる。プラダーウィリー症候群並びにsmall-for-gestational age（以下、SGA）については、ジェノトロピン®の効能・効果に含まれているが、ソマトロピンBS皮下注「サンド」には含まれていない（表2）。

ソマトロピンBS皮下注「サンド」の効能・効果のうち、「骨端線閉鎖を伴わない成長ホルモン分泌不全性低身長症」は、ジェノトロピン®との比較臨床試験結果に基づいて認められたものであり、「骨端線閉鎖を伴わない次の疾患における低身長（ターナー症候群、慢性腎不全）」は、薬理作用からジェノトロピン®と同等の有効性が期待できると判断され、承認申請時に認められたものである。ジェノトロピン®の効能・効果のうち、成人の重症成長ホルモン分泌不全症、プラダーウィリー症候群、およびSGAは、ソマトロピンBS皮下注の承認時には再審査

期間が終了しておらず、ジェノトロピン®の後続品に認められる効能・効果の対象となっていなかった。成人の重症成長ホルモン分泌不全症については、平成22年にジェノトロピン®の再審査期間が終了し、平成23年にソマトロピンBS皮下注「サンド」の効能・追加が承認された。

ソマトロピンBS皮下注「サンド」は、欧米ではOmnitrope®の製品名で承認されている。欧米では別に、Humatrope®を参照としたValtropin®が承認されているが、日本では承認されていない。

エポエチン アルファ後続品

エポエチンは、ヒトエリスロポエチンと同じアミノ酸配列をもつ糖タンパク質であり、主に腎性貧血等の治療薬として使用されている。JANのなかでエポエチンに続くアルファ、ベータ、およびカッパは、糖鎖の違いを表している**。エポエチンには3本のN結合型糖鎖と1本のO結合型糖鎖が結合しており、糖鎖は分子全体の30～40%を占めている。主なN結合型糖鎖の構造は非還元末端にシアル酸が結合した3または4本鎖糖鎖であり、シアル酸は、エポエチンの血中半減期に大きく影響してい

表2 ソマトロピン製剤の効能・効果

	製品名	一般名	効能・効果						
			骨端線閉鎖を伴わない成長ホルモン分泌不全性低身長症	ターナー症候群	慢性腎不全	プラダーウィリー症候群	軟骨異栄養症	成人成長ホルモン分泌不全症（重症に限る）	骨端線閉鎖を伴わないSGA性低身長症
先行品	ジェノトロピン®皮下注用 0.6mg, 1.0mg, 1.4mg 5.3mg, 12mg,	ソマトロピン (遺伝子組換え)	○	○	○	○		○	○
バイオ後続品	ソマトロピンBS皮下注「サンド」 5mg, 10mg	ソマトロピン (遺伝子組換え)	○	○	○			○	
その他	ノルディトロピン®注 5mg, 10mg, 15mg	ソマトロピン (遺伝子組換え)	○	○			○	○	○
	グロウジェクト®注射用 1.33mg, 8mg	ソマトロピン (遺伝子組換え)	○	○				○	
	ヒューマトローブ®注射用 6mg, 12mg	ソマトロピン (遺伝子組換え)	○	○			○	○	
	サイゼン®注 1.33mg, 8mg	ソマトロピン (遺伝子組換え)	○						

(製品名に含まれる剤形は代表的なものを記載した)

** : INNリストには糖鎖が異なるepoetinとして、epoetin alfa, beta, gamma, delta, epsilon, kappa, theta, iota, omega, zetaが記載されている。このうちJAN記載はエポエチン アルファ、ベータ、ガンマ、イプシロンおよびカッパである。darbepoetin alfa (JAN: ダルベポエチン アルファ) は5アミノ酸残基が置換された改変型エリスロポエチンである。エポエチン ベータ ペゴルはpolyethylene glycol (以下、PEG) 化エポエチンであり、INNリストに記載されていない。

る。

日米欧では、表3の通りのエポエチン製剤が承認されている。日本では、エポエチン アルファ（販売名：エスポー[®]、協和発酵キリン）、エポエチン ベータ（販売名：エボジン[®]、中外製薬）およびエポエチン カッパ（遺伝子組換え）[エポエチン アルファ後続1]（販売名：エポエチン アルファ BS注750/シリンジ「JCR」ほか、日

本ケミカルリサーチ）（以下、エポエチンBS）が上市されており、このうちエポエチンBSは、エスポー[®]の後続品として承認された製剤である。エポエチンBSの効能・効果は、先行品エスポー[®]注射液と同様、透析施行中の腎性貧血および未熟児貧血治療である（表4）。

エポエチンBSは、エスポー[®]の後続品であるが、シアル酸結合糖鎖のプロファイルにおいて、両者には差異が

表3 日米欧で承認されているエポエチン製剤

〈文献2〉より改変

INN	製品名（開発会社）			先行品/参照品
	日本	米国	欧州	
epoetin alfa	エスポー [®] (協和発酵キリン)	Epogen [®] /Procrit [®] (Amgen) Eprex [®] (Ortho Biologics)	Eprex [®] /Erypo [®] (Janssen-cilag)	(新有効成分)
epoetin beta	エボジン [®] (中外製薬)		NeoRecormon [®] (Roche)	(新有効成分)
epoetin delta			Dynapo (Shire Pharmaceutical Development) 承認後取り下げ	(新有効成分)
epoetin kappa	エポエチン アルファ BS注「JCR」 (日本ケミカルリサーチ)			エスポー [®]
epoetin zeta			Silapo [®] (Stada Arzneimittel) Retacrit [®] (Hospira)	Eprex [®] /Erypo [®]
epoetin theta			Biopoin [®] (Merckle Biotec) Eporatio [®] (ratiopharm)	(新有効成分)
			Abseamed [®] (Medice Arzneimittel) Binocrit [®] (Sandoz) Epoetin alfa Hexal [®] (Hexal Biotech)	Eprex [®] /Erypo [®]

アミノ酸配列が異なるダルベポエチン、およびPEG化されているエポエチン ベータ ヘコルを除く

表4 エポエチン製剤の効能・効果

	製品名	一般名	効能・効果					
			腎性貧血	透析施行中の腎性貧血	連続携行式腹膜灌流施行中の腎性貧血	透析導入前の腎性貧血	手術施行患者の自己血貯血	未熟児貧血
先行品	エスポー [®] 注射液 750, 1500, 3000	エポエチン アルファ (遺伝子組換え)		○ iv				○ sc
バイオ後続品	エポエチン アルファ BS注「JCR」 750, 1500, 3000	エポエチン カッパ (遺伝子組換え) [エポエチン アルファ後続1]		○ iv				○ sc
その他	エスポー [®] 皮下用 6000, 9000, 12000, 24000	エポエチン アルファ (遺伝子組換え)	○ sc					○ sc
	エボジン [®] 注 750	エポエチン ベータ (遺伝子組換え)		○ iv			○ iv	○ sc
	エボジン [®] 注 1500, 3000			○ iv, sc		○ iv, sc	○ iv	○ sc
	エボジン [®] 注 6000				○ sc		○ iv, sc	○ iv
	エボジン [®] 皮下注 9000, 12000				○ sc		○ sc	
	エボジン [®] 皮下注 24000							○ sc

iv：静脈内投与，sc：皮下投与
(製品名に含まれる剤形は代表的なものを記載した)

認められている（独立行政法人医薬品医療機器総合機構審査報告書より）⁹⁾。糖鎖に差異が認められても、非臨床試験および臨床試験成績により先行品と類似した薬理学的、薬物動態学および毒性学的性質を有することが認められたことから、有効性および安全性に影響を与えないと最終判断がなされ、エスポー[®]の後続品として承認されている。今後、有効性・安全性情報を集積するために、5年間500例以上の製造販売後調査が計画されている。現在、欧州では、平成19年に、INNを取得していない1品目3製品が、平成20年にはepoetin zeta 2製品が、いずれもEprex[®]/Erypo[®]（Janssen-cilag）を参照品としたバイオシミラーとして承認されている（表3）。

フィルグラスチム後続品

フィルグラスチムは、顆粒球コロニー刺激因子類^{***}で、175個のアミノ酸残基からなる一本鎖タンパク質である。N末端がメチオニル化されており、糖鎖は結合していない。好中球前駆細胞に作用して、その分化・増殖を促進させ、骨髄からの好中球の放出を促し、機能を亢進させる。フィルグラスチム製剤は、造血幹細胞の末梢血中への動員、造血幹細胞移植時の好中球数の増加促進、がん化学療法による好中球減少症、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症の治療に支障を来す好中球減少症、骨

髄異形成症候群に伴う好中球減少症、再生不良性貧血に伴う好中球減少症、先天性・特発性好中球減少症に適用されている。日本ではグラン[®]、欧米ではNeupogen[®]の販売名で上市されている。日本薬局方第16改正第一追補より、医薬品各条にフィルグラスチム（遺伝子組換え）並びにフィルグラスチム（遺伝子組換え）注射液が収載される予定である。

欧州では、平成20年にNeupogen[®]のバイオシミラーが次々に承認され、現在6製品が承認されている（表5）。日本国内では、平成23年12月に富士製薬と持田製薬が共同で、また、平成24年3月に興和テバ、大洋薬品、および日本化薬が共同で、医薬品製造販売承認申請を行っている。いずれも先行バイオ医薬品との同等性/同質性にかかわる臨床試験を終了しているため、バイオ後続品として申請されたものと思われる。なお、後者は、欧州各国でテバファーマスーティカル・インダストリーズ・リミテッド（本社：イスラエル）が販売しているバイオシミラーと同じ原薬を使用する製剤である。

さいごに

多くのバイオ医薬品が特許切れを迎え、日本はもとより、欧米およびアジア各国においてバイオ後続品/バイオシミラー開発への関心が高まっている。特許切れの近

表5 日米欧で承認されているフィルグラスチム製剤

日本		米国		欧州	
製品名（開発会社）	先行品	製品名（開発会社）	先行品	製品名（開発会社）	先行品
グラン [®] （協和発酵キリン）	（新有効成分）	Neupogen [®] （Amgen）	（新有効成分）	Neupogen [®] （Amgen）	（新有効成分）
開発コード： FSK0808 ^{*1}	平成23年12月申請			Tevagrastim [®] （Teva Generics）	Neupogen [®]
開発コード： TKN732 ^{*2}	平成24年3月申請			Ratiograstim [®] （Ratiopharm）	Neupogen [®]
				Biograstim [®] （CT Arzneimittel）	Neupogen [®]
				Zarzio [®] （Sandoz）	Neupogen [®]
				Filgrastim Hexal [®] （Hexal）	Neupogen [®]
				Nivestim TM （Hospira）	Neupogen [®]

*1：富士製薬工業株式会社および持田製薬株式会社

*2：興和テバ株式会社、大洋薬品工業株式会社、および日本化薬株式会社

***：日本国内では類似薬として、レノグラスチムおよびナルトグラスチムが上市されている。前者はメチオニル化されていないヒト顆粒球コロニー刺激因子（以下、G-CSF）で、O糖鎖が結合している。後者は改変型G-CSFである。欧米ではフィルグラスチムがPEG化されたpegfilgrastimも承認されている。

い医薬品のなかには、リツキシマブ、トラスツズマブ、インフリキシマブ、およびエタネルセプトなど売上上位を占める大型商品が含まれており、すでに多くの企業がバイオ後続品開発に参入していることが報道・発表されている。前述したように、バイオ医薬品は薬価が高く設定されており、患者負担が大きいことから、70~77%の薬価で販売されるバイオ後続品の普及は、高額医療費を回避する方策の1つとして効果的かもしれない。しかし一方で、Omnitrope[®]開発過程¹⁰⁾や、海外の*epoetin alfa*バイオシミラー製剤¹¹⁾で免疫原性が問題となったように、品質に問題が認められたケースもある。バイオ後続品開発企業には新薬開発と同程度以上の品質管理と十分な市販後安全性調査を、また、使用者側にも、トレーサビリティ確保への協力を望みたい。

引用文献

- 1) 川崎ナナ：バイオ後続品の品質・安全性、有効性確保の指針について. 医薬ジャーナル, 45, 75-80 (2009).
- 2) 川崎ナナ：バイオシミラーとは, “透析療法ネクストXI 新しい腎性貧血治療薬-EPOバイオシミラー”, 医学図書出版, 東京, 2011, pp. 13-21.
- 3) 国立医薬品食品衛生研究所：我が国で承認されたバイオ医薬品.
http://www.nihs.go.jp/dbcb/approved_biologicals.html
- 4) 厚生労働省：生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品）の製造工程の変更にもなう同等性/同質性評価, 薬食審査発第0426001号, 平成17年4月26日.
http://www.pmda.go.jp/ich/q/q5e_05_4_26.pdf
- 5) 石井明子：バイオシミラー医薬品の各国ガイドラインについて—日本におけるバイオ後続品の位置付け及び海外との比較, “透析療法ネクストXI 新しい腎性貧血治療薬-EPOバイオシミラー”, 医学図書出版, 東京, 2011, pp. 22-36.
- 6) European Medicines Agency : Biosimilar guidelines.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp&murl=menus/regulations/regulations.jsp&mid=WC-0b01ac058002958c&jsenabled=true
- 7) U.S. Food and Drug Administration : Biosimilar draft guidances.
<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/Biosimilars/default.htm>
- 8) World Health Organization : Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs).
http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf
- 9) 医薬品医療機器総合機構：エポエチン アルファ BS注「JCR」審査報告書.
http://www.info.pmda.go.jp/shinyaku/P200900068/530210000_22200AMX00238000_A100_1.pdf
- 10) European Medicines Agency : Omnitrope EPAR-Scientific Discussion.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000607/WC500043692.pdf
- 11) K. Praditpornsilpa *et al.* : Biosimilar recombinant human erythropoietin induces the production of neutralizing antibodies, *Kidney international*, 80, 88-92 (2011).

Impact of antiretroviral pressure on selection of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope sequences *in vitro*

Shigeyoshi Harada,^{1,2} Kazuhisa Yoshimura,^{1,2} Aki Yamaguchi,¹ Samatchaya Boonchawalit,^{1,2} Keisuke Yusa³ and Shuzo Matsushita¹

Correspondence
Kazuhisa Yoshimura
ykazu@nih.go.jp

¹Center for AIDS Research, Kumamoto University, 2-2-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-0811, Japan

²AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

³Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kami-youga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

The initiation of drug therapy results in a reduction in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) population, which represents a potential genetic bottleneck. The effect of this drug-induced genetic bottleneck on the population dynamics of the envelope (Env) regions has been addressed in several *in vivo* studies. However, it is difficult to investigate the effect on the *env* gene of the genetic bottleneck induced not only by entry inhibitors but also by non-entry inhibitors, particularly *in vivo*. Therefore, this study used an *in vitro* selection system using unique bulk primary isolates established in the laboratory to observe the effects of the antiretroviral drug-induced bottleneck on the integrase and *env* genes. Env diversity was decreased significantly in one primary isolate [KP-1, harbouring both CXCR4 (X4)- and CCR5 (R5)-tropic variants] when passaged in the presence or absence of raltegravir (RAL) during *in vitro* selection. Furthermore, the RAL-selected KP-1 variant had a completely different Env sequence from that in the passage control (particularly evident in the gp120, V1/V2 and V4-loop regions), and a different number of potential *N*-glycosylation sites. A similar pattern was also observed in other primary isolates when using different classes of drugs. This is the first study to explore the influence of anti-HIV drugs on bottlenecks in bulk primary HIV isolates with highly diverse Env sequences using *in vitro* selection.

Received 15 August 2012
Accepted 20 December 2012

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) shows a high degree of genetic diversity owing to its high rates of replication and recombination and the high mutation rate of the HIV-1 reverse transcriptase (Nájera *et al.*, 2002). Even in a single infected individual, the virus can best be described as a population of distinct, but closely related, genetic variants or 'quasi-species' (Eigen, 1993; Nijhuis *et al.*, 1998). The quasi-species behaviour of viruses is recognized as a key element in our understanding and modelling of viral evolution and disease control (Vignuzzi *et al.*, 2006).

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the *env* sequences of HIV-1 KP-1, KP-2 and KP-4, are AB640872–AB640881, AB641341–AB641351 and AB641335–AB641340, respectively.

Two supplementary figures are available with the online version of this paper.

Combination antiretroviral (ARV) therapy results in a contraction of the viral population, which represents a potential genetic bottleneck (Charpentier *et al.*, 2006; Delwart *et al.*, 1998; Ibáñez *et al.*, 2000; Kitrinis *et al.*, 2005; Nijhuis *et al.*, 1998; Nora *et al.*, 2007; Sheehy *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994). Whilst this bottleneck has a direct effect on the region that is being targeted by the drugs (e.g. protease or reverse transcriptase), it also affects other regions of the viral genome. Indeed, the effect of the drug-induced genetic bottleneck on the population dynamics of the envelope (Env) regions has been addressed in several *in vivo* studies (Charpentier *et al.*, 2006; Delwart *et al.*, 1998; Ibáñez *et al.*, 2000; Kitrinis *et al.*, 2005; Nijhuis *et al.*, 1998; Nora *et al.*, 2007; Sheehy *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994).

Virus bottleneck evolution of the HIV-1 *env* gene might be important when choosing the optimal drugs to treat a particular patient. Indeed, a CCR5 antagonist (maraviroc, MVC) and a fusion inhibitor (enfuvirtide, T-20) have now

been approved for use as HIV-1 entry inhibitors. Analysing the dynamics of drug-induced genetic bottlenecks and studying drug-resistant mutation profiles in response to HIV-1-specific ARV drugs are both important if we are to understand fully HIV-1 drug resistance and pathogenesis.

The aim of the present study was to understand better the effect of *in vivo* drug-induced genetic bottlenecks. *In vitro* selection of different primary HIV-1 isolates was performed using the recently approved HIV integrase inhibitor raltegravir (RAL) (Steigbigel *et al.*, 2008). Two R5-, one X4-, one dual- and one mixed R5/X4-tropic isolates were passaged through a RAL-induced genetic bottleneck. We also performed *in vitro* selection of the R5/X4 isolate using lamivudine (3TC), saquinavir (SQV) and MVC, and compared the results with those from the RAL-selected isolate.

RESULTS

Genotypic profiles of the HIV-1 primary isolates

Four genetically heterogeneous HIV-1 primary isolates (KP-1–4) from Japanese drug-naïve patients were used to assess the extent to which RAL affected the selection of bulk primary viruses *in vitro*. A laboratory isolate, strain 89.6, was also used in the study (rather than a molecular clone) to allow escape mutants to be selected from each quasi-species pool and to be generated *de novo*. First, the sequences of the integrase (IN) regions of the four primary isolates were determined. Table 1 shows the detailed evaluation of the R5/X4 mixture subtype B (KP-1), R5-CRF08_BC (KP-2), R5 subtype B (KP-3) and X4-CRF01_AE (KP-4) primary isolates, and the dual-tropic subtype B laboratory virus (89.6). Although some naturally occurring polymorphisms were observed within the IN regions of these isolates compared with the subtype B consensus sequence available from the Los Alamos National Laboratory HIV sequence database, we did not identify any primary resistant mutations to RAL. Three baseline viruses (KP-1, KP-4 and 89.6) were sensitive to RAL, with IC_{50} values ranging from 1.2 to 4 nM, which are comparable with those reported previously (Kobayashi *et al.*, 2008). However, KP-2 and KP-3 showed minor resistance to RAL, with IC_{50} values of 16 and 32 nM, respectively. These two isolates contained amino acid mutations at positions 72, 125 and 201 within the IN region [previously reported as L-870,810 and S-1360 resistance mutations (Hombrouck *et al.*, 2008; Rhee *et al.*, 2008), but not as RAL-resistance mutations]. KP-2 also contained a unique insertion at position 288 (NQDME) at the C-terminal end of the IN region.

In vitro selection of variants of the primary isolates and 89.6 using RAL

To induce RAL-selected HIV-1 variants *in vitro*, PM1/CCR5 cells, a T-cell line expressing high levels of CCR5, were exposed to the four primary isolates and strain 89.6.

The viruses were then serially passaged in the presence of RAL. As a control, each isolate was passaged under the same conditions, but without RAL, to allow monitoring of spontaneous changes occurring in the viruses during prolonged PM1/CCR5 cell passage (the passage control). The selected viruses were initially propagated at a RAL concentration equal to each IC_{50} value. The RAL concentrations were then increased from 20 to 85 nM during the course of the selection procedure (Table 1).

Only small shifts in the IC_{50} to RAL were observed in four of the five isolates (KP-1, KP-2, KP-4 and 89.6), with fold changes in IC_{50} values of 3.4, 6.5, 16 and 9.2, respectively. KP-3 did not show resistance to RAL. IC_{50} values in all the passage controls were comparable with those of the baseline viruses (Table 1).

IN region sequences in RAL-selected variants

The full-length IN genes were amplified and cloned to determine the genetic basis of selection in the presence or absence of RAL. Ten to 12 clones from each sample were sequenced.

Substitutions within IN were observed at passages 30 (G189R) and 29 (T210I) in two RAL-selected isolates (KP-2 and KP-4, respectively). Neither of these has been reported as IN inhibitor-resistant mutations. No substitutions in the IN regions of KP-3 and 89.6 were found. However, A125T and V180I substitutions were observed in the KP-3 and 89.6 control variants at the last passage. No previously reported mutations were identified in the IN region of KP-1 (an R5/X4 mixture isolate) after 17 passages. However, four amino acids (K7/K111/H216/D278) were selected by RAL from the baseline quasi-species, whereas different amino acids (R7/R111/Q216/N278) were selected in the control-passage variants (Table 1).

Taken together, these findings showed that RAL-induced selection pressure causes adaptation within the IN regions of bulk primary viruses during *in vitro* passage in the target cells, and confirmed that this system can be used to analyse drug-selected variants *in vitro*.

Comparison of *env* gene sequences in RAL-selected and passage-control isolates

A highly diverse gp120 region was observed in the baseline R5/X4 mixture isolate, KP-1; however, the viral diversity of variants passaged in the presence or absence of RAL decreased significantly during *in vitro* selection (overall mean distance after RAL selection of 0.056 at baseline to 0.007 after passage 17; mean overall distance in the passage control of 0.01 after 20 passages, Table 2). Moreover, the RAL-selected and control variants utilized CCR5 to enter the target cell; neither variant used CXCR4 (Table 3).

Interestingly, the low-diversity RAL-selected variant contained a completely different Env sequence from that of the passage-control variant (Fig. 1a). Different regions spanning

Table 1. Susceptibility of HIV-1 isolates to RAL and distinct differences in IN region sequences between RAL-selected and control-passaged viruses

Isolate	Subtype	Tropism	Passage no.	Concn (nM)	RAL-selected variant*		Passage control	
					IN sequence	RAL IC ₅₀ (nM)	IN sequence	RAL IC ₅₀ (nM)
KP-1	B	Mix	0	0	<i>K/R7, K/R111, Q/H216, D/N278</i>	4	<i>K/R7, K/R111, Q/H216, D/N278</i>	4
			8	20	K111, H216, D278	31 (7.8)	R7, R111, Q216, N278	4.5 (1.2)
			17†	20	K7, K111, H216, D278	26 (6.5)	R7, R111, Q216, N278	0.4 (0.1)
KP-2	CRF08_BC	R5	0	0	<i>I201, ins289NQDME</i>	16	<i>I201, ins289NQDME</i>	16
			18	40	<i>G189G/R, I201, ins289NQDME</i>	32 (2)	<i>I201, ins289NQDME</i>	16 (1)
			30	85	<i>G189R, I201, ins289NQDME</i>	55 (3.4)	<i>I201, ins289NQDME</i>	25 (1.6)
KP-3	B	R5	0	0	<i>V72, A125</i>	32	<i>V72, A125</i>	32
			11	25	<i>V72, A125</i>	25 (0.78)	<i>V72, A125</i>	33 (1)
			22	27.5	<i>V72, A125</i>	37 (1.2)	<i>V72, A125T</i>	13 (0.41)
KP-4	CRF01_AE	X4	0	0	—	2.1	—	2.1
			8	40	—	33 (16)	R166R/K, D279N	4.4 (2.1)
			29	40	T210I	22 (10)	G163E, R166R/K, D279N/S	4.1 (2)
89.6	B	R5X4	0	0	—	1.2	—	1.2
			8	15	—	34 (28)	—	4.4 (3.7)
			34	20	—	11 (9.2)	V180I	1.2 (1)

*Amino acid changes in each passage variant are shown. Italicized letters represent mutations relative to the consensus subtype BC or B present in the baseline isolates. Bold letters represent amino acids selected out of the quasi-species cloud. The fold increase in RAL IC₅₀ values is shown in parentheses for *in vitro*-selected variants compared with those in the baseline isolates.

†The RAL variant selected after 17 passages was compared with the control selected after 20 passages.

Table 2. Comparison of amino acid length and number of PNGs between RAL-selected and control-passage KP-1 variants

Passage no.	Genetic diversity*	Mean ENV ₁₋₄₇₄ length (range)†	Mean V1/V2 length (range)	Mean V3 length (range)	Mean V4 length (range)	Mean PNGs (range)
Baseline						
0	0.056	472 (461–480)	69 (60–74)	34 (33–34)	30 (29–31)	24 (22–28)
RAL-selected virus						
2	0.038	479 (472–480)‡	74 (71–74)‡	34 (33–34)‡	31 (29–31)‡	27 (25–28)‡
8	0.0070	480	74	34	31	28 (26–29)
17	0.0070	480	74	34	31	27 (26–27)§
Passage control						
2	0.045	464 (461–466)‡	64 (60–74)‡	34 (33–34)‡	29 (29–31)‡	24 (22–27)‡
8	0.0070	463 (462–463)	62	34	29	23 (22–23)
10	0.0080	462 (459–463)	62	34	29	23 (22–23)
20	0.010	463	62	34	29	23 (22–23)§
P value		<0.0001‡	<0.0001‡	0.91‡	0.0048‡	0.0019‡
						<0.0001§

*Overall mean distance.

†Sequence from gp120 SP to the V5 region (aa 1–474).

‡, § P values were calculated using the homocedastic *t*-test between the RAL-selected and the passage-control variants indicated by the same symbols above.

the whole envelope sequence [from the signal peptide (SP) to V5] were compared in the RAL-selected and passage-control viruses. The results showed that, after only two passages, the gp120, V1/V2 and V4-loop regions within RAL-selected variants were longer than those in the control variants, and the number of putative *N*-linked glycosylation sites (PNGs) was significantly higher than that in the control-passage viruses (Table 2). This phenomenon was seen consistently in two independent experiments.

We also analysed the gp120 sequences in the other four isolates. Although the number of positional differences between the RAL-selected and passage-control variants for these four isolates was lower than that in KP-1 (between three and nine, compared with >40), there was a similar pattern of separation between the Env sequences (Fig. 1). In three of the four isolates (KP-2, KP-3 and KP-4), positional differences were observed in SP, C1 and all the variable regions of gp120 (Fig. 1b–d). In strain 89.6, differences were observed in the C2, C3 and V4 regions (Fig. 1e).

These results suggested that RAL treatment of target cells causes a decrease in viral diversification within quasi-species Env regions via a route different from that in untreated target cells.

***In vitro* induction of RAL-selected V3-loop library virus variants**

To investigate further the effects of RAL on viral Env sequences, we used the V3-loop library virus (JR-FL-V3Lib) developed by Yusa *et al.* (2005), which carries a set of random combinations from zero to ten substitutions (27 648 possibilities) in the V3 loop (residues 305, 306, 307, 308, 309, 317, 319, 322, 323 and 326; V3 loop from Cys²⁹⁶ to Cys³³¹). The variants contained in the library were polymorphic mutations derived from 31 R5 clinical isolates (Yusa *et al.*, 2005). PM1/CCR5 cells were exposed to the JR-FL-V3Lib and serially passaged in the presence of RAL. After two passages, the V3 sequence within the RAL-selected variant was completely different from that in the passage control (Fig. 1f). This suggested that, under pressure from RAL, the infectious clone harbouring different V3 region sequence from the passage control had adapted to the target cells, despite containing the same IN sequences.

Phylogenetic analysis of the Env regions after passage with or without RAL

To confirm the temporal and spatial differences observed in each of the RAL-selected and passage-control viruses, phylogenetic analyses were conducted using complete SP–V5 sequences. The neighbour-joining phylogenetic tree showed a clear and distinct branching between RAL-selected and passage-control KP-1 viruses (Fig. 2a). We also identified a similar pattern in all the other isolates tested (Fig. 2b–e).

Table 3. Comparison of amino acid length, number of potential N-linked glycosylation sites, V3 sequences and co-receptor usage between anti-retroviral drug-selected and control-passaged KP-1 variants

Passage no.	Genetic diversity*	Mean ENV ₁₋₄₇₄ length (range)†	Mean V1/V2 length (range)	Mean V3 length (range)	Mean V4 length (range)	Mean PNGs (range)	V3 region		Geno2 pheno (%)§									
							Prevalence (%)	Sequence‡										
Baseline	0	0.056	472 (461–480)	69 (60–74)	34 (33–34)	30 (29–31)	24 (22–28)	41.9	CTRPNNTRKGIHIGPGKFYATGAIIGDIRQAHC	41.2								
								22.6V.....	41.2								
								16.1-..I.....T.R..T.RD...N..K...	1.7								
								13.0-..I.....T.R..T.KT...N..KK...	2.9								
								3.2-..I.....	7.4								
Passage control	8	0.0070	463 (462–463)	62	34	29	23 (22–23)	3.2D.....	55.3								
								100.0V.....	41.2								
								RAL-selected virus	8	0.0070	480	74	34	31	28 (26–29)	100.0	41.2
								SQU-selected virus	11	0.0040	474	71	34	31	26	100.0	41.2

*Overall mean distance.

†Sequence from gp120 SP to the V5 region (aa 1–474).

‡V3 sequences of each variant are shown. Dots denote sequence identity and dashes indicate a deletion mutation.

§Prediction of viral co-receptor tropism using Geno2pheno based on a selectable ‘false positive rate’.

***In vitro* selection of KP-1 variants by 3TC, SQV and MVC**

To determine whether other HIV drugs also changed the route of adaptation to the target cells, we attempted to select KP-1 variants using a reverse transcriptase inhibitor (3TC), a protease inhibitor (SQV) and a CCR5 inhibitor (MVC). As shown in Fig. 2(f), the pattern of clustering at distinct positions between the selected isolates and the passage-control variants was similar to that observed for the RAL-selected variants. The selected variants showed decreased diversity in the gp120 sequences; however, the length of the gp120, V1/V2 and V4 sequences increased (apart from in the MVC-selected variants). In addition, the number of PNGs within gp120 was higher than that in the control (Table 3). We also compared the V3 sequences between the passage-control and each of the drug-selected variants. The V3 sequences in all the SQV-selected variants and 83.3% of those in the 3TC-selected variants, were comparable with those in the RAL-selected variants. This was not the case for the passage controls. Comparison of variants passaged with RAL and 3TC showed that the length of the V1/V2 and V4 regions and the number of PNGs was similar; however, these parameters were different in the SQV-selected variants (Table 3). This indicated that the time at which a drug acts (e.g. during the early or late phase of the HIV life cycle) influences the selection of Env sequences. During selection with MVC, CXCR4-tropic variants were selected from the baseline mixture after seven passages.

Taken together, these results suggested that, in treated cells, different classes of anti-HIV drugs may suppress the variability of quasi-species during *in vitro* selection via a route different from that in untreated cells.

DISCUSSION

This study evaluated the impact of anti-HIV drugs on the Env bottleneck in bulk HIV-1 primary isolates during selection *in vitro*. RAL-, 3TC- and SQV-selected variants of the unique viral isolate, KP-1, harbouring both X4 and R5 variants and with a very high level of baseline viral diversity, were used to study the final destination (genetic bottleneck) of a large variety of Env sequences. Interestingly, the phylogenetic clustering of RAL-selected KP-1 variants was completely different from that of non-drug-treated controls (Fig. 2). Our results also confirmed differences in the length of the gp120, V1/V2 and V4-loop regions and in the number of PNGs (Tables 2 and 3).

It is not clear why viruses cultured under pressure from the non-Env-directed drug RAL result in different *env* genotypes compared with those without the drug. Thus, we cloned the *IN-env* region of the proviral genome from passaged viruses and sequenced the *env* and *IN* regions on the same cloned plasmid, and compared them among the baseline and passages 1, 2, 8 and 17 of the KP-1 virus. Under low

concentrations of the IN inhibitor RAL, K7 was selected for at a late passage after accumulation of the other three amino acids, K111, D278 and H216, in IN. During the sequential accumulation of these four amino acids (K111, D278, H216 and K7), the RAL-selected Env sequences at passage 17 (the Env sequences shown as filled boxes in Fig. 1) sequentially accumulated mutations in the same proviral genome (Fig. S1, available in JGV Online). However, we did not find a clone including both the RAL-selected Env at passage 17 and RAL-selected IN at passage 17 in the baseline or each passaged virus, except for in the last passage. We also examined the gp120 and IN sequences of the 3TC- and SQV-selected KP-1 variants. Compared with the RAL-selected region, the variable regions of gp120 in these selected variants were very similar to each other, except for the V1/V2 region (Fig. S2). However, the passage-control variant was very different from the drug-selected variants (Fig. 1a). Furthermore, the IN sequences were different in each passaged virus: K111/D278/H216/K7 in RAL-selected, R111/D278/Q216/R7 in 3TC-selected, K111/D278/H216/R7 in SQV-selected and R111/N278/Q216/R7 in virus without drug treatment (underlined residues indicate amino acids different from those in viruses without drug treatment). To explain these results, we believe that, under pressure from anti-HIV drugs (non-entry ARVs), the virus might show a primitive reaction to select for the Env sequence and recombine from quasi-species to gain advantage for entry and/or enhance replication in target cells. Meanwhile, IN was selected from quasi-species by a direct and/or indirect effect of RAL-induced pressure. The combination of both selective pressures may affect the selection for Env and IN during adaptation in drug-treated conditions (Figs 1a and S2). These results suggest that non-entry inhibitors, such as RAL, 3TC and SQV, might also affect cell adaptation to PM1/CCR5 cells.

Many *in vivo* studies have reported the effects of the anti-HIV drug-induced bottleneck on the *env* gene (Charpentier *et al.*, 2006; Delwart *et al.*, 1998; Ibáñez *et al.*, 2000; Kitrinis *et al.*, 2005; Nijhuis *et al.*, 1998; Nora *et al.*, 2007; Sheehy *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994). However, these studies had several limitations. Because viruses were placed under *in vivo* selective pressure using at least two anti-HIV drugs and by the host immune response, it is difficult to separate the different effects and to draw clear conclusions, particularly *in vivo*. Delwart *et al.* (1998) and Kitrinis *et al.* (2005) avoided some of these limitations by employing a heteroduplex tracking assay, although *in vivo* peculiarities still remained. Therefore, we used an *in vitro* selection system using unique bulk primary isolates established in our laboratory (Hatada *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2006, 2010b) to observe the effects of the anti-retroviral drug-induced bottleneck on the *IN* and *env* genes.

This selection provides a sensitive approach for analysing virus population dynamics. The effectiveness of ARV drugs can be examined during the *in vitro* passage of a single variant or mixture of variants without being affected by many of the factors encountered *in vivo*. In addition,

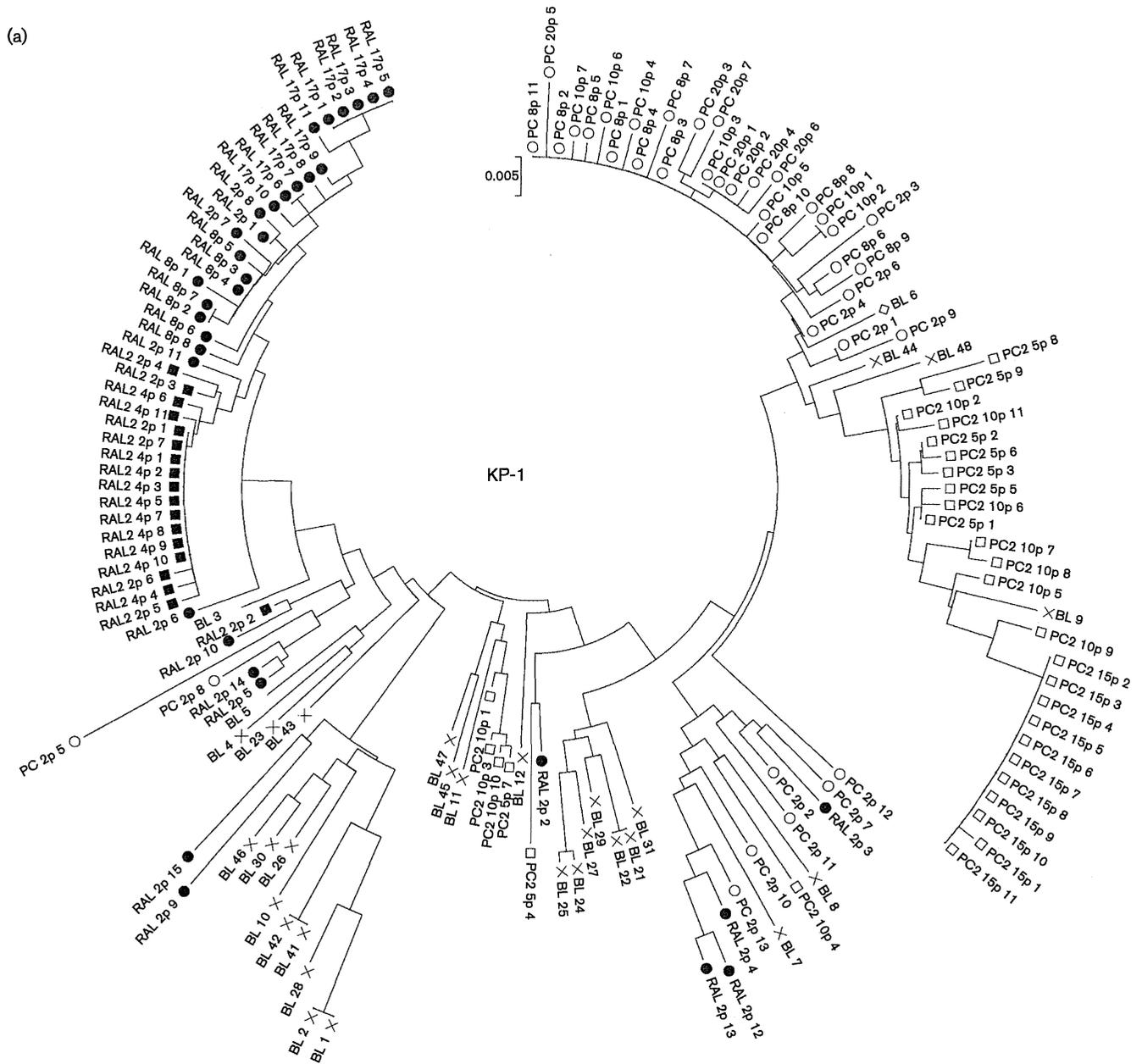


Fig. 2. Phylogenetic analyses of the Env regions from *in vitro*-passaged viruses selected with or without ARV drugs. (a–e) Phylogenetic trees were constructed using gp120 SP–V5 sequences from RAL-selected and passage-control variants of KP-1 (a), KP-2 (b), KP-3 (c), KP-4 (d) and strain 89.6 (e). An ‘x’ represents baseline (BL) variants, and closed and open symbols represent RAL-selected (RAL) and passage-control (PC) variants, respectively. In (a), the results of the second experiment are indicated as RAL2 and PC2, respectively. (f) A phylogenetic tree was constructed using gp120 SP–V5 sequences from RAL-, 3TC-, SQV-, MVC-selected and control-passaged variants of KP-1. ○, Control variants after eight passages; ●, RAL-selected variants after eight passages; ▲, 3TC-selected variants after six passages; ◆, SQV-selected variants after 11 passages; ■, MVC-selected variants after seven passages. The trees were constructed using the neighbour-joining algorithm embedded within the MEGA software.

differences in the Env sequences between the baseline and selected variants can be compared after any number of passages. The results of the present study provide important information that will enhance our understanding of the drug-induced genetic bottleneck. This phenomenon can be

examined *in vitro* using bulk primary isolates treated with or without drugs.

Recently, several new ARV drugs have been licensed for use in HIV-1-infected patients. MVC, approved in 2006, is the