

# 抗病毒药物病毒学研究的申报资料要求

2006年6月 美国 FDA 发布

2009年6月 药审中心组织翻译

西安杨森制药有限公司翻译

北核协会审核

药审中心最终核准

# 目 录

I. 引言.....	1
II. 背景.....	1
III. 非临床病毒学研究.....	2
A. 作用机制研究.....	3
B. 抗病毒活性.....	4
1. 体外抗病毒活性.....	4
2. 血清蛋白存在条件下的体外抗病毒活性测定.....	6
3. 抑制指数.....	6
4. 体内抗病毒活性.....	6
C. 细胞毒性及治疗指数.....	7
D. 体外联合使用的活性分析.....	7
E. 耐药性.....	8
1. 体外耐药病毒株的筛选.....	8
2. 基因型分析.....	9
3. 表型分析.....	9
4. 交叉耐药性.....	10
IV. 针对产生耐药性监测的提议.....	11
V. 病毒学研究报告.....	13
VI. 总结.....	13
附件 提交 HIV 耐药资料的指南.....	13

## 抗病毒药物病毒学研究的申报资料要求

### I. 引言

制定本指南的目的旨在为研发抗病毒药品或生物制品（例如，治疗性蛋白和单克隆抗体）的申请人提供从IND前启动至新药申请（NDA）和上市后阶段的帮助。申请人从本指南中可以初步了解到何种非临床和临床病毒学研究数据对于抗病毒药品的研究性新药申请（IND）、NDA或生物制品许可证申请（BLA）的批准是最重要的。本指南主要关注非临床和临床病毒学研究报告，同时针对收集和提交给美国联邦食品药品监督管理局（FDA）的耐药性研究数据提出建议。基于试验数据撰写的非临床和临床病毒学研究报告是FDA审评抗病毒药物的研究性申请和上市申请的重要文件。本指南中讨论的问题具体包括：

- 明确的作用机制
- 确定研究药物特定的抗病毒活性
- 评价研究药物与其他可能与其合用的抗病毒药之间发生拮抗作用的可能性
- 提供对此研究药物产生病毒耐药性的研究数据
- 提供鉴定研究药物与已批准的其他作用靶点相同的抗病毒药的交叉耐药性研究数据

FDA的指南文件，包括本指南在内并不构成具有任何法律效力的相关责任。实际上，该指南只是描述了目前FDA对某个议题的观点，应将本指南仅视为建议性文件，除非它引用了特定的法规或者法律要求。在FDA指南中使用的“应该”一词表明“建议”或者“推荐”，而不是必须要求的某项内容。

### II. 背景

本指南提出的建议仅仅基于抗病毒药品处的抗病毒药的审评经验，以及药品申请人和学术界的经验。由于本指南只是从大量的HIV-1的研究中总结获得了经验、经历和教训，因此本指南中通常以抗HIV-1产品的评价作为研究其他抗病毒药物的范例。尽管不同病毒的检测方法和模型系统有较大的差异，但本指南中的许多作用机制可以应用于治疗其他病毒感染（如乙型肝炎病毒，丙型肝炎病毒，单纯疱疹病毒，带状疱疹病毒，流感病毒，鼻病毒，巨细胞病毒及人乳头瘤病毒）的抗病毒药物的研发。病毒学领域发展日新月异，所以当积累了新的资料或当出现相关的需要时，我们将对此指南进行修订。

为了方便申请人向本机构提交耐药性研究数据，我们制定了标准格式的文件范例（参见与本指南同时发布的独立文件）。此文件范例作为独立文件发布，旨在帮助申请

人将相关的信息提交给本部门。如有必要，我们会对这些格式文件进行更新，并且提供针对其他类病毒的格式文件。

关于新药临床申请和新药上市申请的总体指南可从[www.fda.gov/cder/regulatory/applications/default.htm](http://www.fda.gov/cder/regulatory/applications/default.htm)处下载。为了方便审评和批准，我们鼓励申请人在进行某一项研究性抗病毒药物研发的早期即与本部门进行联系。为了向具有潜在可能性的申请人提供帮助，FDA同意接受简略格式的IND（即pre-IND），并对其进行审评和评价。如果申请人对于评价研究性药物在人体的研究程序不熟悉，则Pre-IND就显得特别有用。[www.fda.gov/cder/ode4/preind/getting.htm](http://www.fda.gov/cder/ode4/preind/getting.htm)的链接中提供了关于向本部门提交pre-INDs的信息（“获得以IND前程序开始”）。为了加快审评过程，FDA接受申请人提交的电子版的申报资料。关于提交电子申请的信息，可参阅FDA的网站。

建议申请人在研发治疗正痘科病毒、流感病毒、严重急性呼吸综合征（SARS）病毒或其他新出现的急性暴发性感染疾病的研究性药物时，向本部门咨询其他的指导意见。关于治疗天花和其他正痘科病毒的抗病毒药物的相关信息可以参考*疫苗病毒-研发减轻天花疫苗并发症药物的指南草案*<sup>1</sup>。申请人应认真阅读针对特定药物的全部规范性条款<sup>2</sup>和其他适用的政府性和行业性的生物安全和生物安全保障条款。

### III. 非临床病毒学研究

非临床病毒学研究有助于在进行人体试验前评价研究药物的安全性和疗效。建议申请人进行可鉴定研究药物的作用机制、有助于证明研究药物在模型系统中的特定抗病毒活性，并能提供对此研究药物产生耐药的病毒学数据的研究。此外，在临床治疗病毒感染的实践中，通常有必要将一种研究药物与其他已批准的治疗相同适应证的药品合用。在这种情况下，最好先通过体外试验研究两种药物合用的活性，以便发现研究药物与其他抗病毒药物之间发生抗病毒活性方面的负面相互作用（如拮抗）的可能性。

由于制药企业研发的治疗特定病毒性疾病的抗病毒药物很多，所以交叉耐药（对一种药品耐药后，导致病毒对同类的其他药品也产生了耐药性）可能会成为临床实践中的一个主要问题。因此，从科学的角度而言，抗病毒药物研发过程中的下列信息就显得非常重要：

---

<sup>1</sup> 本指南的最终版本代表了FDA目前在该议题上的观点。为了确保您能够得到最新版本的指南，请浏览CDER指南的网页：[www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm)。

<sup>2</sup> 参见42 CFR part 73 以及 <http://www.cdc.gov/od/sap/sitemap.htm>。

- 测定所研究的药物对具有相同目标分子或复合物的其他已批准的药物产生耐药性的相关病毒的抗病毒活性。
- 测定已批准的药品对相同的目标分子或复合物的研究药物产生了耐药性的相关病毒的抗病毒活性。

建议申请人在启动1期临床研究前先进行非临床研究（如作用机制研究、体外抗病毒活性研究、细胞毒性和治疗指数研究，以及血清蛋白结合率对抗病毒活性影响的研究）。当拟研发的药物针对的病毒存在体外感染系统时，申请人应在启动旨在考察研究药物与其他抗病毒药品合用的疗效的临床试验前完成研究药物与其他已批准的针对此病毒药品（如针对相同的蛋白靶点的所有已批准的药品以及可获得的研究药物，应从现存的每一类药物中至少选一种有代表性的药物进行研究）合用的体外活性研究。此外，还建议申请人在对感染某一种病毒的患者进行临床研究前先通过体外试验筛选对研究药物耐药的病毒株，并鉴定耐药病毒类型株的表型和基因型及交叉耐药性。非临床和临床病毒学研究完成后，申请人即可以向FDA提交完整的研究报告，不一定非等到提交NDA申请时一并提交。在下面的章节中，我们将对本部门建议申请人进行的每一类非临床研究的具体信息进行讨论。

## A. 作用机制研究

作用机制研究应在1期临床研究启动前开展。病毒生命周期中的许多阶段都可以成为潜在的抗病毒药物的作用靶点。研究药物可以通过作用于病毒特异性的编码功能而发挥直接的抑制病毒的作用（如酶抑制剂），或者通过其他途径而发挥间接的抗病毒作用（如干扰素诱导的宿主细胞应答）。建议进行下列作用机制的研究：

- 证明药物特异性地抑制病毒复制的能力或抑制病毒特定功能的能力。
- 确定药品的作用部位（如病毒复制酶，蛋白酶）。

申请人可提供能支持其提出的药物作用机制的生物化学方面的、结构方面的、细胞方面、遗传学方面的数据。证明药物作用机制的数据包括（但不仅限于）受体结合数据、抑制酶活性的数据、确定抑制剂与受体复合物结合的X-光晶体结构、编码靶蛋白的基因中的耐药性突变的鉴定。

充分掌握药物的作用机制对于预测药物的毒性、评价耐药性产生的临床研究的设计非常有用。充分了解抗病毒产品的作用机制可使研究者能够对病毒基因组中可能发生导致耐药性突变的区域有所了解。这些区域不仅限于研究药物作用的部位（病毒编码的靶

点)，也可能包括酶的底物或靶蛋白复合物中存在的另一种病毒编码蛋白。耐药性变异的鉴定结果可以为作用机制的体内研究提供依据。

应证明研究药物对病毒靶点作用的特异性，并与其对细胞或宿主蛋白的作用进行对比，尤其是当细胞中也存在类似于病毒的酶时。例如，如果药物的作用靶点是病毒聚合酶，我们会建议申请人证明该产品对病毒聚合酶的抑制活性，同时与其对宿主的DNA聚合酶（如DNA聚合酶 $\alpha$ 、 $\beta$ 及 $\gamma$ ）的抑制活性进行比较。

免疫调节剂的研发过程中还应注意更多的问题。此类产品会对机体的免疫系统产生作用，因而可能会对病毒的复制产生不符合临床意愿的影响，或者对机体产生其他不良影响。对于通过刺激全身免疫反应而发挥作用的研究药物，建议申请人证实抗病毒活性的降低程度，并鉴定出参与药物作用的免疫系统的具体组分。建议申请人应向本部门咨询关于研发治疗病毒性疾病的免疫调节剂或针对其他非病毒性宿主靶点的药物的具体建议。

## **B. 抗病毒活性**

### **1. 体外抗病毒活性**

许多感染人体的病毒可以在细胞培养系统中或动物宿主体内完成完整的生命周期。在这样的情况下，建议申请人在启动人体试验前（即启动1期临床研究前）先通过体外试验证明研究药物和/或其代谢产物的特异性的、可定量的抗病毒活性。这些数据应能清楚的证明在体内研究中，在可接受的风险-受益比的情况下达到的药物浓度具有抗病毒作用，从而为在人体中进行试验提供支持，这一点非常重要。此外，使用相关的细胞类型和病毒分离株进行的体外抗病毒活性和细胞毒性评价（见第III.C.部分，细胞毒性和治疗指数）可以用于指导早期临床试验中选择合适的剂量范围。鼓励申请人使用人类靶细胞的原代培养株进行抗病毒活性研究（如果能够实现）。由于病毒的遗传基因容易发生变异，所以应在多种临床分离株中考察研究药物的抗病毒活性，临床分离株应能代表临床试验中的病毒群。建议申请人开展的支持研究药物研发的抗病毒活性研究包括：

- 评价研究药物对一系列临床和实验室分离株（包括不同的亚群、亚型或基因型）的特异性的抗病毒活性。
- 使用与研究药物具有相同的作用靶分子或复合物的耐药变异株以及对其他已批准的具有相同适应证的耐药的有代表性的病毒株评价研究药物的抗病毒活性。

建议申请人使用定量的检测方法，在研究药物不同浓度的条件下测定病毒的复制，

并与不添加研究药物的测定结果进行比较，确定研究药物的特异性抗病毒活性。研究药物的有效浓度指的是将病毒复制的速度降低50%的浓度（细胞培养试验中用EC<sub>50</sub>表示，生物化学或亚细胞试验中用IC<sub>50</sub>表示）。评价研究药物的抗病毒活性和细胞毒性的方法包括（但不局限于）病毒灭活试验、空斑减数试验、细胞病变效应抑制试验、外周血单核细胞试验以及结合与融合试验。这些试验可以评价其他影响因素包括多重性感染增加以及感染前对病毒或细胞进行预处理与感染后治疗的比较。建议申请人使用传代次数较少的宿主细胞株进行研究。

极为重要的是研究药物的有效浓度应与证明作用机制研究中的数据相一致。如果某研究中的药物抑制病毒复制所需的浓度低于根据假定的作用机制计算出的生化数据，则表示可能存在其他的作用位点或作用机制。当生化数据与抗病毒活性数据不一致时，申请人可以通过耐药性分析证明他们的研究药物在体内的作用机制。对于核苷或核苷酸类似物，建议申请人对在靶组织中处于稳定期及分裂期的细胞中测定活性药物分子的三磷酸盐的半衰期（ $t_{1/2}$ ）。

某些影响人类健康的病毒（如乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒）目前尚无合适的细胞培养或动物模型，对于此类病毒，可以通过对相关病毒关键功能和活性的抑制预示研究药物的潜在活性。如果针对影响人类的病毒目前尚无满意的细胞培养或动物模型时，而且研究药物的作用部位被认为位于细胞内，细胞内的药物浓度与生化研究中的结果相关，在这种情况下，研究清楚抗病毒药物的活性部分是否能进入细胞内就显的尤为重要。目前用于研究乙型肝炎病毒（HBV）和丙型肝炎病毒（HCV）复制的、以细胞为基础的试验，以及宿主细胞株的科研工作取得了一定的进展，但仍然存在很多不足。目前用于检测 HBV 复制的方法包括（但不仅限于）：

- 通过生物化学试验测定HBV DNA聚合酶的活性。
- 使用杆状病毒介导的转入或转染HBV基因组的人肝细胞株进行细胞培养试验，然后用HBV DNA探针经定量Southern blot分析法进行检测。
- 用含有HBV基因组的稳定转染细胞株进行细胞培养试验。
- 采用定量PCR法测量细胞外的HBV DNA。

目前已经研发出了可以用于研究HCV病毒复制的复制子系统，该系统也可用于评价某些抗HCV药物的抗病毒活性<sup>3-4</sup>。此外，近期的研究显示，以细胞为基础的研究HCV体外

---

<sup>3</sup> Lohmann V, F Korner, J-O Koch, U Herian, L Theilmann, and R Bartenschlager, 1999, Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line, *Science* 285:110-113.

<sup>4</sup> Blight K, A Kolykhalov, and C Rice, 2000, Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture, *Science*

复制的系统目前正在研发阶段，该系统可能具有评价抗病毒活性的用途<sup>5</sup>。目前研究中使用的用于考察HCV复制的HCV复制子系统包括（但不局限于）：

- 采用RT-PCR检测HCV复制子细胞中HCV RNA的水平。
- 使用生物化学方法检测HCV RNA聚合酶、HCV丝氨酸蛋白酶或报告酶（如荧光素酶）的活性。

## 2. 血清蛋白存在条件下的体外抗病毒活性测定

血清蛋白能与许多药物结合或整合，从而影响药物的抗病毒活性。建议申请人详细考察研究药物是否能与血清蛋白显著结合。测定血清蛋白结合率的常用方法包括平衡透析法、超滤法以及基于荧光技术的高通量人血清白蛋白和 $\alpha$ -酸性球蛋白结合试验。如果研究药物的蛋白结合率较高，则建议申请人在加入系列人血清稀释液（如5%、10%、20%、40%）条件下测定研究药物的体外抗病毒活性。通过这些数据可以推算出研究药物在100%的人血清中的 $EC_{50}$ ，同时应报告血清校正后的 $EC_{50}$ 值。此外，还建议申请人在含有生理浓度的 $\alpha$ 酸性糖蛋白和人血清白蛋白的条件下测定研究药物的 $EC_{50}$ 值。

## 3. 抑制指数

血浆药物浓度和细胞内药物浓度对于评价抗病毒治疗的量效关系和发生耐药性的可能性非常重要，计算抑制指数（IQ）时也需要用到这些数据。抑制指数（IQ）等于 $C_{min}$ 除以血清校正后的 $EC_{50}$ 值。（关于测定 $EC_{50}$ 值的更多信息请参阅第III. B. 1部分-体外抗病毒活性）我们认为IQ值是综合一种药物的体内浓度和抗病毒活性的有用工具，也是描述药物的暴露程度与病毒对药物敏感性之间相互关系的一个指标。如果一种药物的IQ较高，则表明患者体内的药物能达到有效抑制病毒的浓度，使耐药性发生的概率降到最低。由于同一种剂量可能并不适用于所有的患者人群，所以IQ值也可以用于选择3期和4期临床研究中进一步评价的剂量。

## 4. 体内的抗病毒活性

如果体外细胞培养或复制子系统不能预测药物在人体的抗病毒活性，则可以通过测定接受药物治疗后的动物模型系统的病毒滴度评价研究药物的抗病毒活性。动物模型提供的分析指标包括发生病毒感染（需要有证据证明）后的动物的发病率和死亡率、组织学检查结果、各时间点的病毒滴度定量检测结果、在发生病毒学反弹的动物体内分离到的耐药株的分离和鉴定、病毒抗原和抗体的定量检测结果、研究药物的药代动力学数据

---

290:1972-1974.

<sup>5</sup> Wakita T, T Pietsschmann, T Kato, T Date, M Miyamoto, A Zhao et al., 2005, Production of Infectious Hepatitis C Virus in Tissue Culture from a Cloned Viral Genome, Nat Med. 11:791-6.

以及症状的描述（如神经系统症状、体重减少）。

### C. 细胞毒性及治疗指数

极为重要的是申请人需要证明研究药物在体内可达到的浓度下具有抗病毒活性，同时该浓度的药物不会对细胞产生毒性作用。此外，研究药物在细胞培养模型中表现出的抗病毒活性可能是由于宿主细胞在暴露于药物后死亡所造成的。在细胞毒性试验中，应逐渐增加抗病毒药物的浓度，测定导致50%的宿主细胞死亡的浓度（参见第III. B. 1部分-体外抗病毒活性）。此值标志着研究药物的中位细胞毒性浓度，通常用 $CC_{50}$ 或 $CCIC_{50}$ 来表示。通常又将研究药物抑制病毒复制的效应和诱导细胞死亡的效应比较的相对有效性称为治疗指数或选择性指数（即 $CC_{50}/EC_{50}$ ）。理想的药物应具有最大的抗病毒活性，同时具有最小的细胞毒性（即具有较大的治疗指数）。建议申请人对来源于同时在处于稳定期和分裂期的各种类型的、相关的人细胞和组织细胞进行 $CC_{50}$ 值的测定，确定药物对不同细胞周期、不同细胞类型或不同组织的潜在毒性。申请人应在启动1期临床研究前开展测定细胞毒性和治疗指数的研究。

由于某些抗病毒药物具有针对骨髓的抑制作用，所以建议申请人通过细胞集落形成法评价某些研究药物（如核苷类似物）对人骨髓祖细胞生长的潜在影响。此外，某些研究药物也对负责正常细胞核DNA和线粒体DNA合成及修复的细胞DNA聚合酶具有潜在的抑制作用。申请人应测定待研究的抗病毒药物对细胞的聚合酶的 $IC_{50}$ ，同时应证明研究药物对病毒靶点作用的特异性（与对细胞聚合酶的作用相比）。人体的DNA聚合酶 $\gamma$ 负责线粒体DNA合成，人DNA聚合酶 $\gamma$ 被抑制与线粒体功能缺损之间具有相关性，并会导致人体不良事件的发生。因此，考察某些研究药物（如核苷类似物）对人聚合酶 $\gamma$ 活性的影响以及对线粒体的毒性作用（如乳酸的生成量，线粒体DNA含量、线粒体形态学，葡萄糖利用率）就显得非常重要。

### D. 体外联合使用的活性分析

感染病毒的患者体内可能存在不同的变异病毒株，其中某些类型的病毒株可能对一种或多种抗病毒药物的敏感性较低。因此，对于某些病毒而言，同时给予多种抗病毒药物（如抗HIV-1的三联药物疗法）可能会比使用单一的药物发挥并维持更好的抑制病毒复制的作用。但是不同药物之间的相互作用比较复杂，联合使用后可能会导致药物的抗病毒活性出现相互拮抗、相加或者协同作用。正是出于此原因，申请人应该在体外实验中评价研究药物与其他已批准的、治疗相同疾病药物之间联合用药（两种药物合用）的抗病毒活性。具体来说，应评价研究药物与所有已批准的针对相同蛋白质的药物之间联

合用药的抗病毒活性，对于已批准的治疗相同适应证的每类药物，应至少选择两种合适的药物进行此类研究。建议申请人在启动旨在评价研究药物与其他的抗病毒药物联合使用疗效的临床试验前，先完成研究药物与其他已批准的药物的体外联合用药活性研究。通常许多患者会同时感染 2 种或 2 种以上病毒（如 HIV 和 HBV 或 HCV），因此建议在体外联合用药活性试验时，还应考察用于治疗同时感染不同种类病毒的药物与研究药物合用的体外抗病毒活性。

## E. 耐药性

### 1. 体外耐药病毒株的筛选

本指南主要关注病毒基因组中的突变导致的病毒对特定的抗病毒药物的表型敏感性降低的耐药性。此处所说的耐药性，并不是指绝对耐药，而是一个相对的概念。建议在启动以感染特定病毒的患者为对象的临床研究前，应先通过体外试验筛选对研究药物耐药的病毒株，鉴定耐药株的表型和基因型，并进行交叉耐药性分析。我们知道通过体外试验获得的耐药性数据可能并不能准确的预测临床耐药性，但是仍建议申请人通过体外耐药性筛选试验，评价目标病毒产生对研究药物易感性（即耐药性）屏障的可能性，从而有助于临床试验设计。

通过在细胞培养中筛选对研究药物耐药的病株，可以了解耐药性产生的遗传阈值的界限。遗传阈值低的药物可以选择仅含 1 或 2 处突变的耐药株。而遗传阈值较高的药物则可能在病株中存在多处变异时方可对其产生耐药性。许多研究药物和目标病毒的自身因素可对耐药性产生影响（如药物浓度）。变异株的出现速率取决于病毒复制速率、产生的病毒基因组的数量、复制机制的保真度以及宿主因素。对这些因素的了解有助于设计检测耐药株的体外试验。例如，如果需要存在多种突变方可对高浓度的研究药物产生耐药性，则许多细胞培养系统提供的病毒滴度可能不足以用于筛选耐药病毒。遇到这种情况时，可以在逐渐增加研究药物的浓度的条件下使病毒在细胞培养中系列传代，这样可能会分离到耐药株。鼓励申请人在评价耐药性的体外试验中考察的浓度范围覆盖了研究药物在人体内的预期浓度。选择对研究药物耐药的变异株的试验应重复进行数次（如使用不同的野生株、使用不同的耐药株、在高选择压力及低选择压力下进行试验），确定不同的试验中产生的耐药性突变的类型是否相同，评价药物浓度与耐药性遗传屏障之间的关系。

当采用细胞培养系统复制目标病毒时，可以采用下列两种基本方法分离对研究药物敏感性降低的病毒株：

- 使用较高的病毒起始接种浓度，在固定的药物浓度下繁殖数代，每种药物浓度均检测多次。
- 使用较低的病毒起始接种浓度，病毒传代期间逐渐增加药物浓度，起始药物浓度接近药物对亲代病毒的  $EC_{50}$ 。

对病毒的繁殖情况进行监测，通过对选择期间分离株的基因型和表型的鉴定，检测耐药病株的产生。

HCV 对研究性药物的耐药性可以通过 HCV 复制子系统进行考察。使用 HCV 复制子细胞筛选 HCV 耐药性的方法包括下列几种：

- 在加入新霉素和固定浓度研究药物的条件下，以较低的密度培养 HCV 复制子细胞，不同的检测浓度均培养数份。含有耐药性复制子的细胞将会形成集落，研究者将对其进行基因型和表型鉴定。
- 在固定浓度的研究药物的条件下，进行 HCV 复制子细胞传代，但培养体系中不加入新霉素，不同的检测浓度均培养数份。收集并保存每一代 HCV 复制子细胞，用于表型和基因型鉴定。

## 2. 基因型分析

针对体外试验中筛选出的耐药株进行基因型分析，确定可能导致病毒对研究药物敏感性降低的突变。针对病毒基因组中的相关部分进行 DNA 序列分析，鉴定耐药相关突变，这有益于预测临床结果，并且可以为阐述研究药物的作用机制提供证据。申请人应测定编码目标蛋白的完整基因序列，对于导致病毒对研究药物耐药的突变类型和导致病毒其他同类药物耐药的突变类型进行比较。对于较大的病毒（如疱疹病毒、痘病毒），应对其基因组中与研究药物作用靶点相关的部分进行测序，并分析其中所含的与耐药性产生相关的突变（如标记拯救）。建议在数种类遗传背景（如株、亚型、基因型）中鉴定耐药性产生的通路，对于通过筛选程序获得的分离株，如果其中同时出现了多种变异，则应该鉴定各种变异出现的先后顺序。

进行基因型分析时，鼓励申请人对测序引物进行鉴定，并说明这些引物中有多少碱基可以被准确读出。申请人还应定义用于检测少数病毒亚群的基因型检测方法的灵敏度。重要的是，申请人应阐明该人类的突变类型在基因型分析中的百分比。

## 3. 表型分析

表型分析是用于确定变异株对研究药物的敏感性是否降低。如果通过基因型分析鉴

定出了与耐药性产生可能相关的突变，如有可能，则应在重组病毒系统（即，使用定点突变技术或聚合酶链反应（PCR）技术扩增病毒基因组的相应部位，然后将这些突变导入标准的实验室遗传背景中，或其他适合的系统中）中评价每一种突变导致表型耐药的能力。然后通过体外试验测定重组病毒对药物的敏感性，并确定  $EC_{50}$  值。计算分离株与参比株或亲代株的  $EC_{50}$  值之比（ $EC_{50}$  值增加的倍数）。任何标准的病毒学试验方法（如蛋白质法、病毒 RNA 法、聚合酶法、MTT 细胞毒性法、报告基因表达法）都可以用于计算病毒的表型结果。通过测定分离株的  $EC_{50}$  值，并与在相同条件下，同时测定参比株（生物学特性明确的野生型实验室株）或亲代株的  $EC_{50}$  值，并进行比较，计算分离株敏感性的变化（或耐药性的变化）。由于试验中测得的  $EC_{50}$  值比  $EC_{90}$  或  $EC_{95}$  值更精确，所以在确定敏感性的变化（耐药性的变化）或与参比株、亲代株或基线时分离到的病毒株进行比较时，应优先使用  $EC_{50}$  值。表型检测方法的有用性取决于其灵敏度[即检测临床分离的病毒株较参比病毒株、亲代病毒株或基线临床分离病毒株的敏感性的变化（耐药性的变化）的能力]。计算耐药性变化的倍数（分离株的  $EC_{50}$  值/参比株的  $EC_{50}$  值）时，要求表型检测方法之间具有可比性。

#### 4. 交叉耐药性

使用针对相同蛋白质靶点的抗病毒药物（同一药物类型中的典型药物）治疗时，可能会产生导致针对某一抗病毒药物敏感性降低的变异，同时也可能会导致针对同一类型的其他药物的敏感性降低或失去敏感性。这种现象被称为交叉耐药。交叉耐药并不一定是双向的，因此应该考察其是否存在其他的可能性。例如，如果病毒 X 对 A 药和 B 药耐药，而病毒 Y 也对 A 药耐药，但病毒 Y 仍可能对 B 药敏感。建议通过表型分析评价研究药物对可耐受同类的其他已批准药物的病毒类型株的有效性，同时评价同类药物中已批准的药物对可耐受研究药物的病毒株的有效性。此外，如果以某一蛋白或蛋白复合物为作用靶点的药物属于不同的类型（例如，核苷类逆转录酶抑制剂（NRTIs）和非核苷类逆转录酶抑制剂（NNRTIs），其作用的靶点都是 HIV 编码的逆转录酶），则建议对不同类型的药物进行交叉耐药性分析。建议检测多种重组病毒株和临床分离病毒株（株的范围应能代表已知会导致病毒对同类型药物的敏感性降低的不同突变和突变的组合）对研究药物的表型敏感性。如果表型检测是在含有重组病毒的细胞系中进行的，则应该使用临床分离病毒株对  $EC_{50}$  值进行校验。

#### IV. 建议对耐药性的产生进行监测

基于医务工作者及患者有必要获知抗病毒药物的耐药性信息，以便做出最优的治疗决定。除此之外，方案设计和产品研发计划中的关键性的决定通常取决于耐药性和交叉耐药性数据。因此，我们极力建议申请人根据待研发的药物将来在临床上应用的实际情况，在药物研发的各期临床试验中进行全面的耐药性检测。

对于某些病毒而言，病毒浓度的变化可以作为判定抗病毒药物临床疗效的终点指标。在这种情况下，可以使用测定和监测病毒载量的方法进行耐药性检测。详细的基因型和表型检测结果是考察耐药病毒株是否出现的基础，还有可能显示出病毒的耐药性与临床病毒学失败之间的关系。此外，表型和基因型检测结果还可用于解释治疗方法的选择，用于预测研究性药物治疗某一个体的效用。对来自于治疗失败或发生了病毒反弹的患者的分离病毒株进行基因型分析有助于鉴定导致病毒对研究药物敏感性降低的突变。此外，还建议申请人对基线时分离到的病毒株进行基因型和表型分析，根据基线病毒株的突变情况和多态性及其对药物的表型敏感性判断治疗结果。如果病毒浓度的检测结果未被作为主要终点指标，则研发监测病毒浓度的方法以及监测病毒耐药性的出现对于分析病毒学指标与临床结果之间的关系将会非常重要，而且有助于改善将来进行的临床研究的设计。

建议申请人启动使用已经感染病毒的患者临床研究前，先制订并提交临床研究中监测耐药株产生的计划。耐药性监测计划中应包含下列内容（但不仅限于这些内容）：

- 描述监测病毒滴度的试验方法
- 病毒滴度检测方法及其操作特点（如果有要求）。
- 将会用到的基因型和表型检测方法
- 基因型和表型检测的步骤和操作特点（如果有要求）
- 生物标本采集和保存的方法
- 生物标本的处理和运输方法（冷冻或室温）
- 对附加的耐药性分析进行描述
- 采集用于检测病毒载量、基因型和表型以及其他的耐药性分析的生物标本的时间点（如基线，第 24 周，第 48 周，治疗失败或中止试验后）。

IND 申请的总体临床研发计划中应包含耐药性监测计划。

建议申请人在药物研发的早期阶段制订并提交进行基因型和表型基础试验以及耐药性亚试验的 IND 计划。还建议申请人及时完成对基线和治疗后分离病毒株的基因型和

表型分析，以便于明确研究药物的耐药性信息及其与其他抗病毒药物之间发生交叉耐药的可能性。对于 HBV 和 HCV 而言，对基线和治疗后病毒株的基因型分析是监测基因型耐药株出现的关键。通过对来自于病毒学突破（或反弹）的患者的生物样本进行基因型分析，并将分析结果与对基线生物样本的分析结果进行比较，可以鉴定出与耐药性相关的突变。申请人应提前与本部门就耐药性监测和分析的程度和类型进行讨论，并应取得一致的意见。

一般情况下，我们积极鼓励申请人在以曾接受过治疗的患者为试验对象的研究中收集全部患者基线分离株的表型和基因型数据，同时收集所有病毒学失败和退出研究（病毒复制未得到抑制）的患者的终点分离株的表型和基因型数据。采集病毒学失败或中止研究的患者的生物标本时，应在患者仍在服用研究药物时采集。在以前未接受过治疗的患者为对象的研究中，应设法获得来自于所有病毒学失败和中止研究（病毒复制尚未得到抑制）的患者的基线分离病毒株和终点分离病毒株的表型和基因型数据。因此，在以前未接受过治疗的患者为对象的研究中，应收集并保存所有患者的基线时的生物样本，以备在病毒学失败时进行表型和基因型分析。根据临床研究方案或研究人群的具体情况，有时可能需要进行额外的基因型和表型评价及亚组分析，这就进一步强调了在临床研究的各个阶段（基线及治疗阶段）采集并保存生物样本的必要性。如果体外试验结果显示病毒在获得单一突变后会导致高度的表型耐药，在这样的情况下，申请人可能会建议在基线和病毒学失败时收集以前未接受过治疗的患者亚组的生物标本。但申请人提出的此类提议必须事先与本部门进行讨论。

研究方案中应明确说明病毒学失败和中止研究的定义。申请人可以在药物研发的早期阶段向本部门征求关于定义临床应答失败和临床研究中的耐药性监测计划的建议。建议申请人向本部门咨询关于提交临床病毒耐药数据的详细信息和实例。发布本指南时还提供了协助申请人提交 HIV、HBV、HCV 以及流感病毒研究的耐药性数据的独立文件。我们会对这些范例进行定期的更新，在必要时会增加对其他病毒的范例。

申请人可以选择自己进行病毒滴度的定量检测和表型及基因型的分析工作，也可以将生物样本发送给经过 CLIA（临床实验室改进修正案）认证的公司进行检测。实验室样品的处理应按照适合的操作程序进行。如果某项试验未按照生产厂家的技术规范操作，则该试验的结果可能不会被接受。鼓励申请人使用经过鉴定和验证的已批准的试验方法（如果有可能）。如果使用的检测方法属于研究性的，则建议申请人提供该检测方法的操作特性参数（如准确性、精密度、检测限及定量限、特异性、线性、检测范围、

耐受性、稳定性) 同时应描述病毒来源(如血液、血浆)、保存条件及稳定性、细胞培养程序。方法学验证的定义请参阅指南之*生物分析方法验证*, 指南之*用于抗逆转录病毒药物的血浆 HIV RNA 测定法——加速审评及常规审评的临床考虑*。另外也可参考 ICH 的行业指南之 *Q2A 分析程序的验证*。与用于鉴定研究性药物的抗病毒活性及耐药性资料的探索性检测方法相比, 临床实践中使用的检测方法需要经过更加全面的验证。研究者使用的常规的商业检测方法应该经过鉴定, 但是可能不需要提供方法学参数。申请人应就某一检测方法需要校验的次数和性质以及提交检测方法的方法学参数的机制(如数据主文件) 与本部门进行讨论。建议申请人在 3 期临床研究中进行特定的分析或测量时使用一致的检测方法, 对特定患者的分析检测方法应在研究期间保持不变。如果使用了在药物研发期间出现的任何新的检测方法, 申请人应提供支持这种新的检测方法实施和使用的数据。

## V. 病毒学研究报告

完整的病毒学研究报告的内容比较广泛, 报告中应包含原始数据和衍生数据、获得数据的程序、评价数据所需的信息。病毒学研究报告中应包含研究药物的非临床研究及临床抗病毒活性信息、接受过治疗的患者中产生的对研究药物耐药的信息、与同类药物的交叉耐药的信息、基线基因型和表型病毒学应答分析(如果适用)。病毒学研究报告的格式应与学术出版物的格式相同, 通常应包含下列部分: 概要、引言、材料与方法、结果及讨论。方法部分应描述试验中使用的全部试验方法, 同时应对试验中使用的统计分析方法进行描述。非临床研究和临床研究的病毒学研究报告可以在研究完成后提交, 不一定要等到与 NDA 同时提交。如果申请人按照共同技术文件(CTD) 的格式提交 NDA, 则应把病毒学研究报告及其数据集置于模块 5 的第 5.3.5.4 部分的其他研究中, 以抗病毒报告为段落标题。

## VI. 总结

本指南甄别了与治疗病毒感染的抗病毒药物的研发和申请审核相关的病毒学研究项目。本指南的目的在于促进产生更多抗病毒药物的全面分析。这种分析有助于提供支持将研究性药物应用于人体的数据, 同时还有助于提供确定量效关系、设计临床试验、选择适当的患者人群所需的数据。因此, 这些研究期间收集的数据会对特定药物的治疗成功率产生影响。

由于体外非临床病毒学研究能为体内试验的设计提供有用的信息，而且有助于预测体内试验中耐药株的产生，所以建议在启动 1 期临床试验前先进行非临床研究。开展以感染某种病毒的患者为研究对象的试验前，应详细分析体外试验中筛选到的耐药病毒株。本指南还就如何及何时进行病毒学研究提出了建议。这些信息可以写入产品说明书中，以便临床医生正确的开具抗病毒药物的处方，同时使治疗成功的几率达到最大。为了协助申请人提交从临床耐药性试验中获得的数据，我们还在发行本指南的同时编写了独立的文件，该文件中提供了向本部门提交耐药性数据的格式。

## 附件

### 提交HIV耐药资料的指南

鼓励申请人在提交人类免疫缺陷病毒（HIV）耐药资料时使用以下示例格式。

一份资料集应包括患者数据、终点数据、基因型数据和表型数据。可以采用多种方法细分资料集（例如：按照临床研究、基线分离株、病毒学失败分离株），而且应在提交资料前与该部门进行讨论。

针对每项研究，我们推荐采用SAS传输文件并含下列信息的构建资料集：

- 每名患者每个分离株占用1个记录（行）（例如：基线、失败以及其他时间点）。
- 所有分离病毒株的数据入列（标有下文中推荐的列标题）<sup>1</sup>。
- 应在相应记录中提供在所有患者中有药物治疗经验的每个患者的基线分离病毒株的基因型数据和所有研究中病毒学失败和中止的终点分离病毒株的基因型数据<sup>2</sup>。在首次接受药物治疗患者的研究，应采集并且储存所有患者的基线样本，用于将来病毒学失败时表型和基因型分析。
- 应在相应记录中提供每个患者分离株的基线分离株的表型资料和病毒学失败和中止研究的终点分离株的表型数据<sup>2</sup>。在有药物治疗经验患者的研究中，推荐采集所有患者的基线表型数据。

应与该部门讨论定义病毒学失败的具体标准，在标准中可能包含多个主要和次要的试验方案终点。应与临床病毒学和耐药结果分析的终点保持一致。

推荐的列标题中应包含的信息<sup>1</sup>

#### I. 患者数据：

- 患者识别编号（所有研究采用的识别编号应具专属性）；
- 分离病毒株（例如：基线、第24周、第48周、中止治疗。多个分离病毒株应进行编号。）；
- 分离日期；
- 试验日期（自患者开始接受研究药物治疗起的天数）；
- 既往治疗药物；
- 治疗组；

- 分析检查（是或否）II. **终点数据：**
- 基线的人类免疫缺陷病毒核糖核酸（HIV RNA）（拷贝数/ml）
- 预先设定时间点（例如，第24周和第48周）的HIV RNA（拷贝数/ml），包括基线在内的每个时间点为一列（即：提供每份样本在研究期间的病毒载量）
- 在其他时间点（例如：病毒学应答丧失或者因不良事件中中止治疗）的HIV RNA（拷贝数/mL）
- 终点评价（例如：病毒载量相对于基线的对数改变的平均值）
- 其他终点评价（例如：DAVG）
- 除病毒学失败之外的原因（例如：由于不良反应/事件而中止治疗），对数据适用指征进行审查
- 结果（即：应答、病毒学失败、在病毒抑制中中止治疗、在病毒得到抑制之前中止治疗）
- 中止治疗的原因（即：不良反应/事件、妊娠）或者失败（即：病毒从未得到抑制、反弹）
- 可以包括在额外时间点获得的HIV RNA（拷贝数/ml）

### III. **基因型数据：**<sup>3</sup>

- 进化枝；
- 对于逆转录酶（RT）、蛋白酶和gp160基因型（仅适用于阻止病毒侵入的药物）；每个氨基酸占据一列并将其野生型（WT）氨基酸作为列标题。指明相对于WT标准序列的改变（即：空白表示无改变）；
- 列出关于患者分离病毒株（基线和终点分离病毒株）中蛋白酶抑制剂（PI）的突变总数。应事先与该部门讨论决定应包括的特定突变类型；
- 列出关于患者分离病毒株（基线和终点分离病毒株）中核苷逆转录酶抑制剂（NRTI）的突变总数。应事先与该部门讨论决定应包括的特定突变类型；
- 列出关于患者分离病毒株（基线和终点分离病毒株）中非核苷逆转录酶抑制剂（NNRTI）的突变总数。应事先与该部门讨论决定应包括的特定突变类型。

**示例**（在表1中突出说明了应如何显示基因型信息，但其中没有包括在上文中建议使用的所有列标题。）

表1. 基因型信息示例

患者	分离病毒株	V-82	N-83	I-84	I-85	G-86	R-87	N-88	L-89	L-90	# PI 突变
001	BL							S		M/L	2
001	WK48			V				S		M	3
002	BL	A/T		V				D		M	4
002	WK48	T		V						M	3
003	BL	T		V							2
004	BL			V						M	2

BL = 基线

WK48 = 研究药物治疗的第48周

#### IV. 蛋白酶切割位点（仅适用于蛋白酶抑制剂）：

- NC/p1 Gag切割位点：在列标题中显示出氨基酸和WT的切割位点（如上文基因型中所述），并在发生突变时指明氨基酸的改变；
- p1/p6 Gag切割位点：在列标题中显示出氨基酸和WT的切割位点（如上文基因型中所述），并在发生突变时指明氨基酸的改变。

#### V. 表型数据：<sup>4</sup>

##### 1. 研究药物信息

- 研究药物在基线的半数有效浓度（EC<sub>50</sub>）值；
- 研究药物在基线针对参照病毒株的EC<sub>50</sub>值；
- 与参照病毒株的EC<sub>50</sub>值相比较，研究药物基线EC<sub>50</sub>值的耐药倍数改变；
- 研究药物在终点评价时或者失败时的EC<sub>50</sub>值；
- 与参照病毒株相比较，研究药物在终点评价时或者失败时EC<sub>50</sub>值的倍数改变；
- 与基线相比较，研究药物在终点评价或者失败时间点EC<sub>50</sub>值的倍数改变；
- 复制能力（如适用）

##### 2. 同类已经获得批准的其他研究性抗HIV药物（如适用）信息

- 与参照病毒株相比较，每种已经获得批准和其他研究性抗HIV药物在基线时

<sup>4</sup> 应提供全部研究中所有接受过治疗患者的基线分离株、病毒学失败和中止研究的终点分离株的表型数据。在有药物治疗经验患者的研究中，推荐采集所有患者的基线表型数据。

EC<sub>50</sub>值的倍数改变（如适用）；

- 与参照病毒株相比较，每种已经获得批准和其他研究性抗HIV药物在终点评价时或者失败时EC<sub>50</sub>值的倍数改变（如适用）；
- 与基线相比较，每种已经获得批准和其他研究性抗HIV药物在终点评价时或者失败时EC<sub>50</sub>值的倍数改变（如适用）。

3. *非同类药物但具有同样的靶点蛋白（例如：NRTIs和NNRTIs）的已经获得批准和其它研究性药物（如适用）的信息*

- 非同类的已经获得批准和其他研究性药物，其基线EC<sub>50</sub>值相对于参照菌株的倍数改变（如适用）；
- 每种非同类的已经获得批准和其他研究性药物，在终点评价时或者失败时EC<sub>50</sub>值相对于参照病毒株的倍数改变（如适用）；
- 每种非同类的已经获得批准和其它研究性药物，在终点评价时或者失败时EC<sub>50</sub>值相对于基线的倍数改变（如适用）。

4. *用药方案中其他抗逆转录病毒药物的信息*

- 用药方案中其他抗逆转录病毒药物在基线的EC<sub>50</sub>值相对于参照病毒株的倍数改变，每种药物为1列；
- 用药方案中其他抗逆转录病毒药物在终点评价时或者失败时EC<sub>50</sub>值相对于参照病毒株的倍数改变，每种药物为1列；
- 用药方案中其他抗逆转录病毒药物在终点评价时或者失败时EC<sub>50</sub>值相对于基线的倍数改变，每种药物为1列。

**示例**（在表2中突出说明了应如何显示表型信息，但其中没有包括在上文中建议使用的所有列标题。）

表2. 表型信息示例

样本	药物 X				其它同类药物*		非同类的其他药物*	
	EC <sub>50</sub> 值	参照病毒株 EC <sub>50</sub> 值	相对于参照菌株的 Δ res is	相对于基线的 Δ res is	相对于参照菌株的 Δ res is	相对于基线的 Δ res is	相对于参照菌株的 Δ res is	相对于基线的 Δ res is
	药物 X	药物 X	药物 X	药物 X	药物 Y	药物 Y	药物 A	药物 A
基线								
终点								

药物X =候选药物

Δ res is =耐药倍数改变，例如：药物X治疗样本的EC<sub>50</sub>值

药物X针对参照菌株（或者基线）的EC<sub>50</sub>值

Ref strain = 参照病毒株（或者 WT）

终点 = 预先设定的用于终点评价的时间点（例如：第24周、第48周、失败或者中止治疗）

\*注释：对于所有已经获得批准的抗HIV药物，应包括相对于参照病毒株的 Δ res is和基线的 Δ res is。

#### VI. 联合受体用法（所有靶点为联合受体的药物）：

- 基线分离病毒株的联合受体用法。在一列中用R5、X4、D表示双嗜性、M表示混嗜性、如果测定无法区分双嗜性或者混嗜性则用D/M表示；
- 基线R5嗜性测定值（例如：RLUs）；
- 基线X4嗜性测定值（例如：RLUs）；
- 病毒学失败以及研究结束分离病毒株（治疗时）的联合受体用法。在一列中指明R5、X4、D表示双嗜性、M表示混嗜性、如果测定无法区分双嗜性或者混嗜性则用

D/M表示；

- 在失败或者研究结束时的R5嗜性测定值（例如：RLUs）；
- 在失败或者研究结束时的X4嗜性测定值（例如：RLUs）。

**VII. 治疗药物的监测数据（可获得时）：**

- 患者的最小血药浓度（ $C_{min}$ ）；
- 经过校正的血清抑制指数（IQ）（ $IQ = C_{min} / \text{经过校正的血清}EC_{50}\text{值}$ ）