

抗HIV药物非临床药效学研究技术指导原则

二〇〇六年十一月

目 录

一、 概述	2
二、 一般原则	3
三、 主要研究内容	3
1. 体外药效学研究	3
2. 体内药效学研究	5
3. 作用机理研究	6
4. 耐药性研究	6
四、 结语	7
五、 参考文献	7
六、 著者	8
附录一、抗 HIV 药物非临床药效学研究的一般方法	9
附录二、耐药性研究的相关问题	14
附录三、名词解释	15

一、概述

艾滋病的全称是“获得性免疫缺陷综合征”（Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS），它是由艾滋病病毒，即“人类免疫缺陷病毒”（Human immunodeficiency virus, HIV）感染而导致的一种传染性疾病。

HIV在分类学上属于逆转录病毒科（Retroviridae）、慢病毒属（Lentivirus）、灵长类慢病毒群（Primate lentivirus group）。HIV分为二型：HIV-1 和 HIV-2。HIV-1 为全球性流行，HIV-2 主要流行于非洲少数国家。HIV-1 较 HIV-2 有更强的传播和致病能力。由于目前的研究和治疗经验主要针对 HIV-1，本指导原则主要涉及抗 HIV-1 的药物。根据目前的认识，HIV 感染人体的靶细胞是免疫系统的 CD₄⁺ 淋巴细胞，HIV 的复制过程分为融合进入、基因逆转录、基因整合、基因表达、病毒组装及释放等阶段，抗 HIV 药物研究的靶点主要针对上述几个阶段。

本指导原则介绍了抗 HIV 药物非临床药效学研究的一般原则和主要内容，还收录了抗 HIV 体内外药效学研究的一般方法等，供研发者参考。本指导原则主要涉及抗 HIV 的化学药物，不包括中药、生物制品、预防用药和免疫调节剂等。

本指导原则根据目前的认知提出一些观点和建议，旨在引导和推动我国该类药物非临床药效学研究与发展，并帮助研发者理解

对临床试验和/或临床应用有重要意义的的数据，并非强制性要求。研发者可根据品种的具体特点和基础研究情况，采用其他适宜的方法，但应对采用的方法及其可靠性进行说明。

二、 一般原则

1、不同的抗 HIV 药物作用机制不同，各有特点，可根据具体情况确定药效学研究的内容和顺序。

2、体外药效学研究是阐明药物具有抗 HIV 作用的基础，是抗 HIV 药物研究与评价的基本内容。

3、体内药效学研究对于进一步说明药物的抗病毒作用、指导临床试验有重要的参考价值。

4、应阐明药物作用的主要靶点或病毒复制的阶段，在此基础上鼓励进行深入的作用机制研究。

5、HIV 具有高度的变异性，极易产生耐药性。耐药性研究有助于确定药物的临床适用范围，鼓励进行该项研究。

6、联合用药的体外药效学研究对抗 HIV 药物的临床应用配伍有一定的提示作用，可视具体情况考虑进行此项研究。

三、 主要研究内容

1、 体外药效学研究

HIV 可以在体外细胞培养系统完成复制周期。在进行临床试验前，应对药物和/或其主要代谢产物进行可定量的体外抗病毒活性研究，

以证明药物的抗病毒效果，从而支持药物进入临床试验。体外抗病毒活性研究得到的剂量－效应关系可以指导临床试验剂量的选择。由于 HIV 具有高度的变异性，体外抗病毒活性研究应使用具有代表性的 HIV 毒株，特别是应在原代人外周血单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cells, PBMC）/HIV 临床分离株培养系统中验证其抗 HIV 活性。

体外药效学试验需要首先确定一个没有细胞毒性的药物浓度，以便在细胞培养模型上区分药物的抗病毒活性和药物导致的细胞死亡。应在药物浓度逐渐增加的情况下使用定量试验测定 HIV 复制的情况并与没有药物存在的情况进行比较。治疗指数（Therapeutic index, TI）是评价药物体外抗 HIV 活性的最重要指标。体外药效学研究就是要在不同细胞培养系统中，测定药物对 HIV 临床分离株和实验室适应株的抗病毒活性，分别计算出治疗指数。具体试验方法可参考附录中的相关内容。

药物对 HIV 的有效抑制浓度应与作用机理提示的数据一致。如果药物抑制 HIV 复制的浓度低于作用机理研究所提示的浓度，提示可能存在其他作用靶点或机理。

血清蛋白可以结合并屏蔽很多药物，从而影响药物的抗病毒活性。建议对血清蛋白结合率高的药物进行血清蛋白存在情况下的体外抗病毒活性研究。

联合用药是目前临床抗 HIV 治疗的基本原则，主要目的是减少或延缓耐药性毒株的产生。推荐与已经上市的、具有不同作用机理、作

用靶点和代谢特征的药物进行联合抗病毒活性研究，这对于确定临床联合用药方案具有一定的提示作用。

2、 体内药效学研究

目前尚缺乏理想的 HIV 感染动物模型，但体内药效学研究对于进一步说明药物的抗病毒作用、指导临床试验仍有重要的参考价值。目前可供评价抗 HIV 药物体内有效性的动物模型主要有二种：（1）猴艾滋病毒（Simian immunodeficiency virus, SIV）感染模型：SIV 与 HIV-1、HIV-2 同属慢病毒，可感染恒河猴、食蟹猴等。该模型既可考察药物在体内对病毒复制的抑制作用，又可观察给药后免疫功能重建的情况。（2）人淋巴组织重建的严重联合免疫缺陷小鼠模型（Sever combined immunodeficient-human, SCID-hu）：将人外周血淋巴和单核细胞或胸腺组织移植给 SCID 小鼠，然后感染 HIV。

尽管SIV感染模型与人艾滋病感染的病毒不同，其发病机理、临床表现、病毒学及免疫学特征等也有差异，但SIV和HIV均属于逆转录病毒科慢病毒亚科，有较高的核苷酸序列同源性，具有相同的生活周期。SIV可选择性地攻击猴的CD₄⁺细胞，猴感染SIV后出现与人艾滋病相似的发病过程和病理特征，是目前用于评价抗HIV药物相对较好的动物模型。SCID-hu小鼠模型也可用于抗HIV药物的体内药效学研究，但需严格的饲养条件。

动物感染模型给药后观察的指标包括：（1）病毒学指标：病毒滴度、病毒抗原量以及病毒载量，耐药性病毒的分离和鉴定等。（2）

免疫学指标： CD_4^+ / CD_8^+ 细胞数、淋巴细胞功能等。（3）临床指标：症状、发病率和死亡率。（4）组织病理学指标：组织病理学变化。具体试验方法可参考附录一中的相关内容。

3、作用机理研究

由于目前尚缺乏理想的HIV感染动物模型，体外抗病毒活性与人体内实际情况的相关性又具有一定的局限性，作用机理研究对于进一步阐明药物的抗HIV作用、确定药物的临床治疗定位和联合用药方案具有重要的意义，对预测药物的毒性和阐明耐药产生的机理也是有价值的。作用机理研究包括：（1）确定药物特异性抑制病毒复制或病毒特定功能的能力。（2）确定药物作用的靶点，例如：病毒融合进入、逆转录酶、整合酶、蛋白酶等。

除上述基本的机理研究以外，还可以采用生物化学、结构学、细胞学、遗传学等方法进一步研究药物对病毒的受体结合、酶活性、结合活性、蛋白剪切加工、病毒颗粒装配等方面的作用；测定药物的X-射线晶体结构、分析作用靶点的耐药性基因变异特征等。另外还应通过对病毒和细胞/宿主蛋白靶点的研究证明药物作用的特异性，特别是在细胞内有病毒酶类似物存在的情况下。例如，如果药物作用于HIV多聚酶，相对于宿主细胞的DNA多聚酶（例如DNA多聚酶 α ， β ， γ ），药物对HIV多聚酶的活性应更为显著。

4、耐药性研究

鼓励创新性抗HIV药物进行耐药性研究。在研究中应重点关注两方面的问题：一方面是药物对HIV耐药毒株是否有抗病毒活性，另一

方面是药物是否容易诱导病毒产生耐药性以及耐药性毒株的基因型和表型耐药性特性。

四、 结语

非临床药效学研究与评价是抗 HIV 药物评价的重要组成部分,对于该类药物的临床试验与临床定位有重要的提示价值。在尚无理想的动物模型的情况下,应更加重视体外药效学研究与评价。鼓励进行体内药效学研究,尽可能提供有提示价值的相关研究资料。

抗 HIV 药物非临床药效学研究应按照药物研发的客观规律分阶段持续地进行,在进行临床试验前提供必要的、足够的有效性提示信息,在临床试验和临床应用过程中还应根据实际情况和需要进行深入研究。

由于抗 HIV 药物研究与评价是一项不断发展和探索的课题,本指导原则也将随着研发和认知水平的提高不断修订和完善。

五、 参考文献

- 1、 FDA: Guidance for Industry: Antiviral Drug Development — Conducting Virology Studies and Submitting the Data to the Agency (*DRAFT GUIDANCE*). 2005. 5
- 2、 FDA: Guidance for Industry: Role of HIV Drug Resistance Testing in Antiretroviral Drug Development (*DRAFT GUIDANCE*). 2004. 12
- 3、 抗人免疫缺陷病毒 (HIV-1) 药药效学指导原则草案, 蒋岩等, 1999

- 4、 中药新药治疗艾滋病非临床有效性研究与评价专题会纪要，药审中心，2005.3

六、 著者

《抗 HIV 药物非临床药效学研究技术指导原则》课题研究组

附录一：

抗 HIV 药物非临床药效学研究的一般方法

HIV 可用传代人 T 淋巴细胞或原代人外周血单个核细胞培养，T 嗜性的病毒株可导致人 T 淋巴细胞出现特征性细胞病变，如细胞融合、多核巨细胞等。M 嗜性的病毒株一般不导致细胞病变，可通过检测培养上清液的 HIV p24 抗原、病毒 RNA 或逆转录酶活性监测病毒复制的情况。体外药效学试验一般应重复三次。

目前尚缺乏理想的 HIV 感染动物模型，常采用替代模型或经过改造的小动物模型来评价药物的体内抗 HIV 活性，如感染猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)或嵌合病毒(Simian/human immunodeficiency virus , SHIV)的猴模型和感染 HIV 的人淋巴组织重建的严重联合免疫缺陷小鼠模型(Sever combined immunodeficient-human, SCID-hu)。

本附录收入了目前较成熟和常用的抗 HIV 体外、体内药效学试验方法，供研发者参考。今后可根据研究进展情况进一步修订。

一、体外药效学试验

1、病毒和细胞

(1) 病毒：应尽可能选择多种生物学表型和基因型的病毒株，包括 HIV 实验室适应株和有代表性的 HIV 临床分离株。在进行抗 HIV 耐药性毒株的药效学研究时，应选用耐药性毒株；对于明确作用靶点的药

物，应首先选择对该作用靶点药物耐药的毒株。

(2) 细胞：应尽可能选择多种细胞。常用的有传代人 T 淋巴细胞系（如 CEM、MT4、MT2、C8166、H9 等）、单核巨噬细胞系（如 U937 等）和活化的人原代外周血单个核细胞（PBMC）。

(3) 病毒感染剂量的确定：测定 HIV 的感染剂量一般采用在 96 孔细胞培养板上微量培养滴定的方法，通过观察细胞病变或检测病毒标记物，如 HIV p24 抗原或逆转录酶等，计算出病毒的感染性滴度（半数组织培养感染剂量，50% Tissue culture infectious dose, TCID₅₀）。在不同的细胞系/病毒株培养系统，使用的病毒感染剂量不尽相同，一般选用 100 ~ 1000TCID₅₀。

2、药物的细胞毒性测定：将不同浓度的药物加入细胞培养板中，在特定条件下培养一定时间，用适宜的方法测定活细胞的比例，计算药物对细胞的毒性（半数细胞毒性浓度，Median toxic concentration, TC₅₀）。

3、抗 HIV 活性测定：

(1) 试验分组

空白对照组：正常培养的细胞。

阳性对照组：阳性对照药与病毒和细胞共同培养。阳性对照药一般选择与受试药物作用靶点相同的临床有效药物。

阴性对照组：药物溶媒与病毒和细胞共同培养。

病毒对照组：病毒和细胞共同培养。

药物对照组：受试药物与细胞共同培养。

试验组：受试药物与病毒和细胞共同培养。

(2) 感染和给药方法：一般采用药物、病毒、细胞同时培养的方式，也可以根据药物作用的靶点采取药物先与 HIV 作用再加细胞、药物先与细胞作用再加 HIV 或 HIV 先感染细胞再加药物的感染和给药方式。

(3) 监测指标和方法：

细胞病变：在显微镜下观察细胞的形态，观察有无 HIV 特征性的细胞病变（合胞体以及细胞融合）。

HIV 抗原：用 ELISA 方法检测培养上清液中的 HIV p24 抗原浓度。

逆转录酶：用同位素掺入或其他方法检测培养上清液的逆转录酶活性。

根据细胞病变观察、p24 抗原或逆转录酶检测的结果，计算药物对病毒的抑制活性（半数抑制浓度，Median inhibition concentration, IC_{50} ）。

4、药效学评价指标

由于病毒的存活与复制依赖于宿主细胞，而抗病毒药物本身有一定的细胞毒性，因此不能仅以细胞病变、p24 抗原或逆转录酶活性作为药效学评价的指标，而应以治疗指数（TI）为主要的评价指标。一般认为治疗指数大于 10 的药物可能具有体外抗 HIV 活性。

5、药物的联合抗 HIV 活性测定

将 2-3 种不同的药物加入到同一实验体系中，按照前述的方法监测病毒的抑制情况，判断药物对病毒的联合作用。实验中除了设置一般体外药效学研究需要的对照以外，还应有各单药对照。联合抗 HIV 活性测定的数据分析方法比较复杂，需采用特定的模型和软件。

二、体内药效学试验

1、SIV 感染猴模型

(1) 病毒：SIV 毒株，静脉注射或粘膜感染。

(2) 动物：恒河猴、食蟹猴等，体重 5 公斤左右，动物数应满足评价的要求，一般每组 4~6 只。

(3) 病毒感染剂量的测定：可采用两种方法，一种方法是用保存的毒种在体外感染猴淋巴细胞，初步确定病毒的感染剂量。一般选择三个剂量组，每组间 10 倍稀释，每个稀释度接种两只猴，感染后不同时间取血，通过细胞培养测定病毒滴度，并定量检测 SIV RNA，以两只猴均感染的最小剂量作为最小感染量 (Monkey infectious dose, MID₁₀₀)。另一种方法是用感染猴的血浆接种猴，感染后每周取血测定 SIV 抗原和细胞培养病毒，计算半数感染量 (Median infectious dose, ID₅₀)。

(4) SIV 感染猴治疗试验：

急性感染治疗试验：猴静脉注射 10~100ID₅₀ 或 5MID₁₀₀ 的 SIV，同时或 4 小时后口服或注射最大无毒剂量以下 2 倍递减 2 个剂量的药物，每天给药，连续 8 周。每周取血，培养病毒，测定 SIV p27 抗原

滴度和SIV RNA，计算保护百分率，并与病毒对照组进行比较。给药前、停药当天和停药后 8 周进行淋巴结检查，观察免疫系统的病理改变。另外，还要测定 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞数和 CD_4^+ / CD_8^+ 比值。

慢性感染治疗试验:猴静脉注射 $10 \sim 100ID_{50}$ 或 $5 \sim 10MID_{100}$ 的SIV，感染后 60 天左右开始给药，一般试验组在最大无毒剂量以下 2 倍递减 2 个剂量。每天给药，连续 8 周。于给药前、给药第 8 周、停药当天和停药后 8 周取血，测定SIV p27 抗原滴度和SIV RNA，计算保护百分率，并与病毒对照组进行比较。给药前、停药当天、停药后 8 周进行淋巴结检查，观察免疫系统的病理改变。另外，还要测定 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞数和 CD_4^+ / CD_8^+ 比值。

2、HIV 感染 SCID-hu 小鼠模型

(1) 动物: SCID 小鼠，4~8 周龄，雌性，静脉注射人 PBMC 或移植人胚胸腺/肝脏组织。

(2) HIV感染剂量测定: 将HIV细胞培养上清液 10 倍连续稀释 5 个浓度，静脉注射或移植组织注射感染小鼠。1 周后取小鼠的血液、脾、淋巴结和腹腔洗液，定量培养，测定病毒滴度，HIV p24 抗原、病毒载量，计算 ID_{50} 。

(3) 药物毒性测定: SCID-hu小鼠灌服或静脉注射给药，测定急性毒性和亚急性毒性，计算半数致死量 (Median lethal dose, LD_{50}) 和最大耐受量 (0% Lethal dose, LD_0)。

(4) HIV感染SCID-hu小鼠药物治疗试验: SCID-hu小鼠腹腔注射 $10 \sim 100ID_{50}$ HIV，2~24 小时后灌服或静脉注射给药。感染 1 周后，取血

液、脾、淋巴结和腹腔洗液，定量培养，测定病毒滴度，HIV p24 抗原、病毒载量，计算抑制率和半数有效剂量 (Median effective dose, ED₅₀)，并与病毒感染对照组进行比较。

附录二：

耐药性研究的相关问题

考察药物对 HIV 耐药性毒株是否有抗病毒活性，至少应该评价对相同作用靶点的耐药性毒株的抗病毒活性，所选用的耐药性毒株应该经过全面的鉴定。由于抗 HIV 药物已经有很多种，交叉耐药性是临床上的一个重要问题，因此应关注药物对于相同作用靶点有耐药性的病毒的抗病毒活性，及已上市药物对受试药物诱导的耐药毒株的抗病毒活性。耐药毒株的试验结果可提示药物用于该类耐药株的临床有效性。

考察药物是否容易导致病毒产生耐药性以及耐药性毒株的生物学特性，可在体外进行耐药毒株的诱导试验，以确定药物是否容易导致病毒产生耐药性以及耐药性毒株的基因型和表型特征，并检验交叉耐药性。

有些药物的遗传阈值比较低，病毒基因发生 1~2 个点突变就可产生耐药性，而有些药物的遗传阈值比较高，需要多个基因位点的突变才能产生耐药性。可采用两种方法诱导药物的耐药毒株：(1) 病毒在固定的药物浓度下连续传代，可使用多个不同药物浓度的培养系统，这种方法对于遗传阈值低的药物比较有效；(2) 病毒在逐渐增加

药物浓度的情况下连续传代培养，药物浓度从 IC_{50} 值的一半起始，监测病毒复制的情况并诱导出耐药毒株。

用基因型和表型方法对诱导出的耐药毒株进行鉴定。基因型分析可以确定哪些基因突变导致HIV对药物的敏感性下降，主要方法是对HIV基因组中药物作用的靶基因进行核酸序列测定，并与野生毒株的靶基因序列进行比较。对传代过程中不同代次的毒株进行序列测定可确定多个突变出现的先后顺序。表型耐药性分析能够确定突变的病毒是否对药物的敏感性下降以及下降的程度。耐药性相关基因突变的确定有助于使用重组病毒系统评估这些突变导致的表型耐药性，也就是使用定点诱变系统或PCR方法扩增病毒基因组相应的部分引入这些特定的突变，以便检测重组病毒在体外对药物的敏感性；也可以采用在含有不同浓度药物的培养基中培养的方法，通过测定HIV抗原、HIV RNA、HIV逆转录酶、细胞毒性或报告基因的表达等确定 IC_{50} 值并与参考毒株的 IC_{50} 进行比较，以 IC_{50} 增加的倍数作为衡量表型耐药性的指标。

附录三：

名词解释

半数组织培养感染剂量 (Tissue culture infectious dose , $TCID_{50}$): 是使 50%细胞感染的病毒稀释度。

半数有效量 (Median effective dose): 是能引起 50%阳性反应或 50%最大效应的浓度或剂量，分别用半数有效浓度 (EC_{50})、半数抑制浓度 (IC_{50}) 或半数有效剂量 (ED_{50}) 表示。如果效应指标为毒性或死

亡，则可改为半数毒性浓度（TC₅₀）、半数毒性剂量（TD₅₀）或半数致死浓度（LC₅₀）、半数致死剂量（LD₅₀）表示。

治疗指数（Therapeutic index, TI）：药物诱导细胞死亡的效力与抑制病毒复制的效力的比值（50%细胞毒性浓度/50%有效抑制浓度，TC₅₀/IC₅₀），

半数致死量（Median lethal dose, LD₅₀）：在一定试验条件下引起50%动物死亡的剂量。

最大耐受量（0% Lethal dose, LD₀）：不引起受试动物死亡的最高剂量。