

抗病毒药物病毒学研究申报资料要求的指导原则

二〇一二年五月

抗病毒药物病毒学研究申报资料要求的指导原则

一、概述

病毒感染是危及人类健康和生命的疾病之一，目前已有很多抗病毒药物上市应用，但仍不能完全满足临床治疗的需求。近年来国内外相关制药企业不断投入大量资金研发抗病毒药物，抗病毒药物的注册申请也逐渐受到各方面的关注。

根据试验数据撰写的非临床和临床病毒学研究报告是审评抗病毒药物的临床试验申请和上市申请的重要资料。本指导原则旨在帮助研发抗病毒药物或生物制品（例如：治疗性蛋白和单克隆抗体）的申请人初步了解哪些非临床和临床病毒学研究数据对于抗病毒药物或生物制品申报临床试验或申请上市是最关键的。

本指导原则主要关注非临床和临床病毒学研究报告，同时对需要收集和提交的耐药性研究数据提出了建议。讨论的主要问题包括：

- 明确作用机制
- 确定所研究药物特定的抗病毒活性
- 评价所研究药物与其他可能合用的抗病毒药之间发生相互作用的可能性
- 提供病毒对所研究药物产生耐药性的研究数据
- 提供所研究药物与已上市的其他相同作用靶点抗病毒药物的交叉耐药性的研究数据

二、背景

近年来，国内外在抗HIV-1药物的研究方面积累了大量的经验，

也取得了很多进展。因此，本指导原则以抗HIV-1药物为范例，介绍抗病毒药物病毒学研究的一般原则。尽管不同病毒的检测方法和模型系统有较大的差异，但本指导原则的许多抗HIV药物研发的原则适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等国内常见病毒）的抗病毒药物的研发。病毒学领域研究发展日新月异，所以，当积累了新的资料或出现相关需求时，我们将对本指导原则进行修订。

三、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药物的有效性和安全性。建议申请人进行药物的作用机制、药物在模型系统中的特定抗病毒活性的研究，并提供对药物产生耐药的病毒学数据。此外，临床上常将一种药物与其他已上市的治疗相同适应症的药物联合使用，因此，最好通过体外试验研究两种或两种以上药物联合用药的抗病毒活性，以便发现所研究药物与其他抗病毒药物之间可能存在的相互作用（如拮抗、协同、增强、叠加等），尤其应关注负面的相互作用。

由于已上市的抗病毒药物很多，交叉耐药（病毒对一种药物耐药后，对同类的其他药物也产生了耐药性）可能会成为临床应用中的一个主要问题。因此，在抗病毒药物的研发过程中，下列信息显得非常重要：

- 测定所研究药物对相同作用靶点的其他已上市药物的耐药病毒株的抗病毒活性。

- 测定已上市药物对由相同作用靶点的所研究药物诱导的耐药病毒株的抗病毒活性。

申请人在开始I期临床试验前应先进行非临床研究(如作用机制研究、体外抗病毒活性研究、耐药性研究,以及血清蛋白结合率对抗病毒活性影响的研究等)。

如果病毒有合适的体外感染模型系统,在开始旨在考察所研究药物与其他抗病毒药物合用疗效的临床试验前,申请人应完成所研究药物与其他已上市的针对此病毒药物合用的体外活性研究,如针对相同靶点有多种已上市的药物和研究药物,应从每一类药物中至少选一种有代表性的药物进行研究。

在对感染某一种病毒的患者进行临床试验前,应先通过体外试验诱导对所研究药物耐药的病毒株,并鉴定耐药病毒株的表型和基因型及交叉耐药性。

(一) 作用机制研究

在I期临床试验前应进行作用机制研究。充分掌握药物的作用机制对于临床试验的设计非常重要,可使研究者了解病毒基因组中发生导致耐药性突变的可能区域,这些区域不仅限于所研究药物作用的靶位(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外的病毒或宿主编码蛋白。耐药性突变的鉴定结果也可以为机制研究和临床研究提供依据。

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。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抗病毒作用(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)。建议进行如下作用机制研究：

- 证明药物具有特异性地抑制病毒复制或抑制病毒特定功能的能力。
- 确定药物作用的靶点（如病毒复制酶、蛋白酶等）或作用于病毒复制的哪个阶段（如病毒进入、入核等）。

申请人可提供支持其药物作用机制的生物化学、结构学、细胞学、遗传学等方面的数据。证明药物作用机制的数据包括但不限于受体结合、抑制酶活性、确定抑制剂与受体复合物结合的X-光晶体结构、编码靶蛋白基因的耐药性突变位点的鉴定等。

应比较所研究药物对病毒靶点及细胞或宿主蛋白作用的选择性，当宿主细胞中存在或可能存在与病毒酶类似的酶时，此点尤其重要。例如，如果药物的作用靶点是病毒聚合酶，建议申请人证明该药物对病毒聚合酶的抑制活性，同时比较其对宿主细胞的DNA聚合酶（如DNA聚合酶 α 、 β 及 γ ）的抑制活性。

研发免疫调节剂还应注意更多问题。此类药物会对机体的免疫系统产生作用，因而可能会对病毒的复制起不到抑制作用，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免疫调节剂，建议申请人证实其抗病毒活性，并鉴定出参与作用的免疫分子或免疫细胞。

（二）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，建议申请人在开始 I 期临床试验前先通过体外试验证明所研究药物和/或其代谢产物的特异的、可定量的抗病毒活性。这些数据应能清楚地证明在体内、在可接受的风险/收益比的情况

下达到的药物浓度具有抗病毒作用，从而为人体试验提供支持，这一点非常重要。此外，使用相关的细胞和病毒临床分离株进行的体外抗病毒活性和细胞毒性评价[见第三部分（三）细胞毒性和治疗指数]可以指导早期临床试验选择合适的剂量范围。

鼓励申请人使用人靶细胞的原代培养细胞进行抗病毒活性研究。由于病毒的基因容易发生变异，所以应使用多种临床分离株考察所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。建议进行的抗病毒活性研究包括：

- 评价所研究药物对一系列病毒实验室适应株和临床分离株（包括不同的亚群（clades）、亚型(subtypes)或基因型(genotypes))的特异性抗病毒活性。
- 评价所研究药物对相同作用靶位或复合物药物耐药的病毒株、对其他已上市具有相同适应症的药物耐药的的代表性耐药病毒株的抗病毒活性。

应使用定量的检测方法，在不同浓度药物的条件下测定病毒的复制，并与不添加药物的测定结果进行比较，确定药物的剂量依赖的特异性抗病毒活性。

药物的有效浓度是指使病毒复制的水平降低50%的浓度（细胞培养试验中用 EC_{50} 表示，生物化学或亚细胞试验中用 IC_{50} 表示）。评价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、病毒抗原或核酸检测、感染性病毒颗粒检测、含报告基因的病毒或细胞检测等。可能影响这些试验的因素包括病毒感染复数（Multiplicity of Infection, MOI）和给药时间（如病毒

感染前给药或感染后不同时间给药)。建议申请人使用传代次数较少的宿主细胞进行研究。

药物的有效浓度与作用机制研究的数据应一致，如果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，则提示可能还存在其他的作用位点或机制。当抗病毒活性数据与生化数据不一致时，可以通过耐药性分析证明药物在体内的作用机制。对于核苷或核苷酸类似物，建议在细胞的稳定期及分裂期测定药物活性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等）目前尚无合适的细胞培养系统或动物模型。对于此类病毒，可以通过对亲缘关系很近的病毒关键功能和活性的抑制揭示药物的潜在抗病毒活性。如果目标病毒目前尚无合适的细胞培养系统或动物模型，而且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一致时，确定抗病毒药物的活性部分能否进入细胞内尤为重要。目前用于研究乙型肝炎病毒（HBV）的细胞系和基于细胞的检测方法还非常有限。研究丙型肝炎病毒（HCV）进入、复制和感染的基于细胞的试验取得了一定进展，但还存在很多不足。

目前用于检测 HBV 复制的方法包括但不限于：

- 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基因组到人肝细胞株进行细胞培养试验，然后用HBV DNA探针经Southern Blot定量分析检测HBV cccDNA及RI-DNA等的形成。
- 用含有HBV基因组（复制可调控或不可调控）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。

对于HCV,目前有助于研究病毒进入（或受体）的假病毒系统（HCVpp）、研究病毒复制的复制子系统（Replicon）以及研究完整病毒复制周期的病毒感染系统（HCVcc），这些系统均可用于评价药物对HCV的抗病毒活性。遗憾的是HCVcc系统目前仅在2a亚型中取得成功。目前用于评价药物抗HCV活性的方法包括但不限于：

- 体外检测药物对病毒靶标蛋白（HCV RNA聚合酶、HCV丝氨酸蛋白酶）的抑制活性。
- 采用不同亚型复制子系统评价药物对不同亚型HCV复制的抑制作用。通过报告基因检测病毒抗原的表达水平，或通过RT-PCR检测HCV复制子细胞中HCV RNA的水平。
- 在HCVcc系统中，通过检测病毒中报告基因编码产物（如荧光素酶或绿色荧光蛋白等）的活性反映药物对病毒的抑制作用。也可以通过RT-PCR检测HCV复制子细胞中HCV RNA的拷贝数，或定量检测病毒抗原水平。

2.血清蛋白存在条件下的体外抗病毒活性

血清蛋白能与许多药物结合或螯合，从而影响药物的抗病毒活性。建议申请人详细考察药物是否能与血清蛋白显著结合。测定药物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 α -酸性糖蛋白结合试验。如果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%）条件下测定药物的体外抗病毒活性。通过这些数据可以推算出药物在100%

人血清中的 EC_{50} ，同时应报告血清校正后的 EC_{50} 值。此外，建议申请人在含有生理浓度的 α -酸性糖蛋白和人血清白蛋白的条件下测定药物的 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的可能性非常重要，计算抑制指数（Inhibitory Quotient, 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。测定 EC_{50} 值的更多信息可参阅第三部分（二）第1节-体外抗病毒活性。IQ值是一个综合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，可使耐药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，所以IQ值也可以用于指导III期和IV期临床试验剂量的选择。

4.体内抗病毒活性

在体外抗病毒活性研究的基础上，可进一步通过动物感染模型来评价药物的抗病毒活性。动物模型的分析指标包括病毒感染后（需要有证据证明）动物发病率和死亡率、组织学检查、各时间点的病毒载量、在发生病毒反弹的动物体内耐药株的分离和鉴定、病毒抗原和抗体的定量检测、药代动力学数据以及症状（如神经系统症状、体重减少等）。

（三）细胞毒性及治疗指数

申请人应在临床试验前开展药物细胞毒性和治疗指数的研究。需要证明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。应排除测定的药物抗病毒活性是由于宿主细胞死亡所造

成的可能。这一点非常重要。

在细胞毒性试验中，应设置抗病毒药物的浓度梯度，测定导致50%的宿主细胞死亡的浓度[参见第三部分（二）第1节-体外抗病毒活性]，即所研究药物的半数细胞毒性浓度，通常用 CC_{50} 或 $CCIC_{50}$ 来表示。治疗指数或选择性指数（即 CC_{50}/EC_{50} ）则是药物的细胞毒性效应与抑制病毒复制效应的比值。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。

由于某些抗病毒药物对骨髓有抑制作用，建议申请人采用细胞集落形成法评价某些药物（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。申请人应测定抗病毒药物对细胞聚合酶的 IC_{50} ，同时应证明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 γ 负责线粒体 DNA 合成，人 DNA 聚合酶 γ 被抑制与线粒体功能缺损之间具有相关性，并会导致人体不良反应的发生。因此，考察某些药物（如核苷类似物）对人聚合酶 γ 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。

（四）体外联合用药的活性分析

感染病毒的患者体内可能存在不同的病毒变异株，其中某些类型的病毒株可能对一种或多种抗病毒药物具有耐药性。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 的联合药物治疗法）可能会比使用单一的药物产生并维持更好的抗病毒作用。但是不同药物之间的相互作用比较复杂，联合用药后可能导致药物的抗病毒活性出现相互拮抗、相加或者协同等作用。因此，申请人应在体外试验中评价药物与其他已上市的、治疗相同疾病药物之间联合用药的抗病毒活性。具体来说，应评价所研究药物与所有已上市的针对相同靶点的药物之间联合用药的抗病毒活性，对于已上市的治疗相同适应症的不同靶点的药物，应选择两种或两种以上进行此类研究。

建议申请人在开始评价联合用药疗效的临床试验前，先完成体外联合用药的活性研究。有时患者会混合感染两种或两种以上的病毒（如：HIV 与 HBV 或 HCV 共感染），因此，体外联合用药活性试验还应考察治疗同时感染不同种类病毒的药物与所研究药物合用的体外抗病毒活性。

（五）耐药性

1. 体外耐药病毒株的选择

本指导原则主要关注病毒基因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。这里所说的耐药性并不是绝对耐药，而是一个相对的概念。建议在开始以感染特定病毒的患者为对象的临床试验前，先通过体外试验选择对药物耐药的病毒株，鉴定耐药株的表型和基因型，并进行交叉耐药性分析。尽管通过体外试验获得的耐药性数据可能并不能准确预测临床耐药性，但仍建议申请人通过体外耐药株选择试验评价目标病毒对药物产生耐药性的屏障，从而有助于临床试验的设计。

通过在细胞培养中选择对药物耐药的病毒株，可以了解耐药性产生遗传阈值的高低。遗传阈值低的药物可以选择仅含 1 或 2 个突变位点的

耐药株。而遗传阈值较高的药物则可能在病毒株中发生多处突变才产生耐药性。药物和目标病毒的许多因素可对耐药性产生影响,如药物浓度。突变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,如果需要发生多个突变方可对药物产生耐药性,则许多细胞培养系统提供的病毒滴度可能不足以用于选择耐药病毒。遇到这种情况时,可以在逐渐增加药物浓度的条件下使病毒在细胞培养中连续传代,这样可能会选择出耐药株。在评价耐药性的体外试验中,药物的浓度范围应覆盖其在人体内的预期浓度。选择对药物耐药的突变毒株的试验应在下列条件下重复进行:使用不同的野生株、使用不同的耐药株、高选择压力及低选择压力等,并确定不同的试验中产生的耐药性突变的类型是否相同,以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选择对药物敏感性降低的病毒株:

- 病毒以较高的 MOI 接种宿主细胞,在多种固定的药物浓度下分别连续传代,诱导耐药株的产生。
- 病毒以较低的 MOI 接种宿主细胞,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} 。

采用合适的方法对病毒的复制进行监测,通过对选择期间分离株的基因型和表型的鉴定,检测耐药毒株的产生。

HCV 对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:

- 在含新霉素的培养基中,多种固定的药物浓度下,以较低的密度

培养 HCV 复制子细胞。含有耐药性复制子的细胞将会形成集落，应对其进行基因型和表型鉴定。

- 在不含新霉素的培养基中，多种固定的药物浓度下，进行 HCV 复制子细胞传代。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药物敏感性降低的基因突变。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，这有利于预测临床疗效，并且可以为阐述药物的作用机制提供证据。应测定编码目标蛋白的完整基因序列，对于导致病毒对所研究药物耐药的突变类型和导致病毒对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），应对其基因组中与所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。建议在几种遗传背景（如毒株、亚型、基因型）中鉴定耐药性产生的通路；通过选择程序获得的毒株如果同时出现了多种突变，则应该鉴定各种突变出现的先后顺序。

进行基因型分析时，鼓励申请人注明测序引物的序列，并说明这些引物可扩增出目标基因的碱基数。还应说明用于检测少数病毒亚群的基因型检测方法的灵敏度。阐明该突变在基因型分析中的比例和种类是十分重要的。

3.表型分析

表型分析用于确定变异株对药物的敏感性是否降低。通过基因型分析鉴定出与耐药性产生可能相关的突变后，如有可能，则应在重组病毒

系统（即：使用定点突变技术，PCR 扩增突变片段并导入实验室标准株或使用其他适合的系统）中评价每一种突变导致表型耐药的能力。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。计算突变株与对照株（生物学特性明确的野生型实验室株）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都可用于计算病毒的表型耐药的变化（如病毒相关蛋白检测、PCR 检测病毒 DNA 或 RNA、细胞病变检测、MTT 法检测细胞毒性、报告基因表达检测等）。通过测定突变株的 EC_{50} 值，并与在相同条件下同时测得的对照株的 EC_{50} 值进行比较，计算突变株敏感性的变化（耐药性倍数的变化）。由于试验中测得的 EC_{50} 值比 EC_{90} 或 EC_{95} 值更精确，应优先使用 EC_{50} 值。表型检测方法的选择取决于其灵敏度，即检测耐药株较对照株的敏感性变化（耐药性的倍数）的能力。计算耐药性的倍数（耐药株的 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

使用针对相同靶点的抗病毒药物治疗时，对某一种药物敏感性降低的变异，同时也可能会对相同靶点的其他药物的敏感性降低或丧失，这种现象称为交叉耐药。交叉耐药并不一定是可以类推的，因此评价所有可能性非常重要。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 可能仍对 B 药敏感。建议通过表型分析评价所研究药物对同类的已上市药物的耐药毒株的有效性，同时评价同类已上市药物对所研究药物的耐药毒株的有效性。此外，如果药物的作用靶点相同，但结构类型不同[例如，核苷类逆转录酶抑制剂（NRTIs）和非核

核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs), 其作用的靶点都是 HIV 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。建议检测多种耐药株和临床分离病毒株对所研究药物的表型敏感性 (范围应能代表已知可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)。如果表型检测是在病毒感染细胞系中进行的, 则应该使用临床分离病毒株对 EC_{50} 值进行校验。

四、针对耐药性产生的监测

应帮助医生及患者了解抗病毒药物的耐药性信息, 以协助其做出最佳的治疗决策。除此之外, 临床试验方案设计和药物研发计划通常与药物的耐药性和交叉耐药性情况密切相关。因此, 强烈建议申请人根据药物预期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监测。

对于某些病毒, 病毒载量的变化可作为判定抗病毒药物临床疗效的终点指标。在这种情况下, 可以用测定病毒载量的方法进行耐药性监测。基因型和表型检测是考察耐药病毒株是否出现的基础, 还有可能表明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指导治疗方法的选择, 或预测药物在某一患者个体的疗效。对治疗失败或发生了病毒反弹的患者中分离到的病毒株进行基因型检测可以发现导致病毒对所研究药物敏感性降低的基因突变。此外, 进行基线基因型和表型分析, 可以根据基线病毒株的突变和多态性及表型敏感性判断治疗结果。如果病毒载量未被作为主要终点指标, 则建立检测病毒载量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非常重要, 而且有助于完善拟进行的临床试验的设计。

建议申请人在开始以病毒感染的患者为对象的临床试验前，首先制订耐药性监测计划，并作为临床试验方案的一部分。耐药性监测计划应至少包含下列内容：

- 描述检测病毒载量的试验方法
- 病毒载量检测方法及其操作特点
- 拟采用的基因型和表型耐药性检测方法、步骤和操作特点
- 样本采集和保存的方法
- 样本的处理和运输方法（冷冻或常温）
- 拟进行的其他耐药性分析
- 采集用于检测病毒载量、基因型和表型以及其他耐药性分析样本的时间点（如基线、第 24 周、第 48 周、治疗失败或中止试验后）

建议申请人在药物研发的早期阶段即制订基因型和表型耐药的基线研究以及有关耐药性课题的计划。申请人应及时完成有关基线耐药和治疗后分离病毒株的基因型和表型分析，以便明确所研究药物的耐药性特征以及与其他药物的交叉耐药情况。对于 HBV 和 HCV 等病毒，监测基线和治疗后病毒的基因型耐药对评估耐药突变的发生至关重要。通过比较分析治疗失败患者的样本和基线样本基因型，可以发现与耐药性相关的突变。试验方案中应明确说明病毒学失败和中止研究的定义。

对于以经治患者为对象的临床试验，强烈建议申请人收集全部患者研究初始的基线分离病毒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）等终点时的表型和基因型数据。并注意应在患者仍在服用所研究药物时完成样本采集。

在以初治患者为对象的临床试验中，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。在以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。

根据临床试验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或亚组分析，因此在临床试验的各个阶段（基线及治疗阶段）采集并保存样本是非常必要的。申请人有时会提出当体外数据提示病毒在单一突变后导致高度表型耐药时，在基线和病毒学失败时收集初治患者亚组的样本。对这样的研究方案事先应进行讨论。

申请人可以选择自己进行病毒载量的检测和表型及基因型耐药性分析，也可以将生物样本委托给其他有资质的实验室进行检测。实验室样品的处理应按照合适的操作程序进行。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试验方法。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。与用于鉴定药物的抗病毒活性及耐药性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。研究者使用的常规商业检测方法应该经过鉴定，但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相关的方法学参数[如数据主控文档（DMF）]与审评人员进行讨论。建议申请人在 III 期临床试验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试验期间

保持不变。如果在药物研发期间使用了任何新的检测方法，应提供支持这种新检测方法的相关数据。

五、病毒学研究报告

完整的病毒学研究报告内容比较广泛，应包含原始数据和相关衍生数据、获得数据的程序和评价数据所需的信息。病毒学研究报告中应包含药物的非临床研究及临床抗病毒活性信息、接受过治疗的患者的耐药信息、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。

病毒学研究报告的格式通常应包含下列部分：概要、引言、材料与方法、结果及讨论。在方法部分应描述使用的全部试验方法，同时应对使用的统计分析方法进行描述。

六、总结

本指导原则介绍了抗病毒药物研发和申请审评相关的病毒学研究项目，目的在于使对抗病毒药物的分析更加全面。这种分析有助于提供支持药物应用于人体的数据，同时还有助于确定量效关系、设计临床试验、选择合适的患者人群。因此，这些研究数据会对药物的治疗成功率产生影响。

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，所以在开始 I 期临床试验前须先进行非临床研究。开展以感染某种病毒的患者为研究对象的临床试验前，应详细分析体外试验中选择到的耐药病毒株。本指导原则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，以便临床医生正确开具抗病毒药物处方，同时使治疗成功率达到最大。

由于临床治疗的需求，抗病毒药的研发已成为新药开发的关注点。同时，病毒学研究的经验逐渐积累，研究水平亦在不断提高。建议申请人在开展抗病毒药物的病毒学研究时关注本指导原则中提及的要素，同时鼓励申请人就新药临床前和临床病毒学研究的相关问题与审评机构进行讨论和沟通。

参考文献

FDA. Guidance for industry: Antiviral Product Development — Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. 2006.6