

인면역결핍 바이러스 *pol* 유전자 염기서열 결정에 의한 지도부딘 (ZDV) 내성 돌연변이의 탐지

울산대학교 의과대학 미생물학교실, 아산생명과학연구소¹, 전북대학교 의과대학 내과학교실²,
전남대학교 의과대학 피부과학교실³, 부산대학교 의과대학 내과학교실⁴

조영걸 · 이희정 · 성흥섭 · 김유겸 · 김영봉 · 이용진¹
김미정¹ · 김대곤² · 원영호³ · 조군제⁴

=Abstract=

Detection of Mutations to Zidovudine in the *pol* Gene of Human Immunodeficiency Virus-1 by Direct Sequencing

Young Keol Cho, Hee Jung Lee, Heung Sup Sung, Yoo Kyum Kim,
Young Bong Kim, Yongjin Lee¹, Mi Jung Kim¹, Dae Ghon Kim²,
Young Ho Won³, and Goon Jae Cho⁴

Department of Microbiology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Institute for Life Sciences¹, Department of Internal Medicine, Chonbuk National University Hospital², Department of Dermatology, Chonnam National University Hospital³, Department of Internal Medicine, Pusan National University Hospital⁴

The nested polymerase chain reaction (PCR) assay was used to determine the sequences of reverse transcriptase (RT) codons 41, 67, 70, 210, 215 and 219 of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) *pol* gene. Template DNA was obtained from uncultured peripheral blood mononuclear cells from 27 Korean HIV-1 infected patients treated with ZDV and Korean red ginseng. The second PCRs were done for 2 separated regions (RT codons 13~98 and 152~259) with 5 μ l of the first PCR product. Nucleotide sequences were determined by direct sequencing. In the 27 patients, CD4+ cell count decreased from $230 \pm 117/\mu$ l to $152 \pm 162/\mu$ l for 46 ± 26 months (Mo), and actual duration of ZDV intake was 27 ± 16 Mo. In the 16 patients who had been treated with ZDV therapy ≥ 25 Mo, the incidences of 70R, 215F/Y, and 41L were 61%, 28% and 22%, respectively and those of 67N, 210W and 219Q were 17%. The incidences of 215F/Y were 6.7% for group ≤ 12 Mo treatment, 22.7% for group with 13 to 24 Mo, and 27.8% for group ≥ 25 Mo. There was no mutation in 9 patients. It might be associated with the interruption of ZDV therapy for more than 6 months in 6 patients. This study shows that the detection of mutation could be useful prognostic marker with other clinical and virological data, and very low mutation rate is detected compared to overseas reports.

Key Words: HIV-1, Reverse transcriptase, ZDV resistance, Direct sequencing

서 론

Human immunodeficiency virus (HIV)-1는 역전사 효소 (reverse transcriptase; RT)의 low fidelity와 high viral turnover로 인해 높은 돌연변이율을 갖는다. 따라서 어떤 antiretroviral drug pressure에서도 특정 아미노산의 치환 (substitution)이 일어나 내성이 유발되며, 실제로 현재 사용되고 있는 모든 약제들에 대한 내성이 보고되고 있다 [24].

1986년부터 AIDS 치료제로서 가장 먼저 사용해진 지도부딘 (zidovudine; ZDV, AZT) [10,32]은 복용 후 빠르게는 3개월부터 내성이 발현되기 시작하며 [2,19,21] 시험관내 subinhibitory drug concentrations에서도 ZDV에 대한 내성을 유발한다 [18]. 따라서 ZDV 단제요법 (monotherapy)의 효과는 장기적인 측면에서는 의문시 되어 왔으나 [16] 단백질분해억제제를 포함한 삼제요법 (triple combination therapy)의 한 약제로써 널리 사용되고 있다. ZDV를 장기간 복용하면 RT codons 41, 67, 70, 210, 215 및 219번째 아미노산이 특정 아미노산으로 치환되고, 치환된 아미노산의 수가 많을수록 약에 대한 민감도가 더 떨어져 내성 정도가 더욱 높아진다 [2,11,16,19~21].

ZDV에 대해 가장 먼저 내성 돌연변이가 일어나는 부위는 역전사효소의 70번째 아미노산으로, 빠르게는 치료 후 12주째부터 아미노산 lysine (K)이 arginine (R)로 바뀐다 (K70R). 그러나 K70R은 비교적 불안정하여 흔히 6개월 내지 12개월 후 wild type (WT)으로 되돌아가기도 한다. 이러한 WT으로의 복귀는 T215F/Y가 나타나는 것과 병행하여 일어난다 [2]. 실제 K70R의 내성 정도는 강하지 않아 infectious clone속으로 이 mutation을 유도하면 약 8배의 감수성 저하를 초래한다 [20]. 그리고 215F/Y가 생기면 약 16배의 감수성 저하가 초래되는 중등도의 내성이 유발되고, 좀더 진행되면 D67N과 K219Q가 생겨 100배 이상의 감수성 저하를 가져오는 고도 내성 (high-level drug resistance)추가 된다 [2]. 약 4배 정도 감수성 저하를 초래하는 41L의 출현은 215F/Y와 동반하여 나타난다. 이 경우 약 60~70배의 감수성 저하를 그리고 41L+67N+70R+215F/Y가 함께 나타나면 약 180배의 감수성 저하를 가져온다 [2,18,19,21].

이러한 내성 발현을 촉진시키는 요인들로는 크게 숙주 요인, 바이러스 요인 및 약물 요인이 있

다. 숙주 요인으로는 질환이 진행된 경우 (advanced HIV disease)와 낮은 CD4+ 세포수, 바이러스 요인으로 높은 혈장 HIV RNA 농도, 감염시 이미 존재하는 약제 내성 바이러스 및 합포체 유도주 (syncytium-inducing phenotype), 그리고 약물과 관련된 요인으로는 용량이 충분하지 않은 (suboptimal drug levels) 경우나 poor compliance가 있다 [24].

한편 국내에서는 1991년부터 국제적인 치료 기준인 CD4+ 세포수 500/μl 이하인 HIV 감염자들에게 정부에서 무상으로 ZDV를 제공하여 왔다. 저자 등에 의한 ZDV에 대한 첫 임상 효능 평가에서 외국에서처럼 6개월 이내부터 내성이 빠르게 나타나서 ZDV 복용 18개월 이후까지 CD4+ 세포수 증가나 p24 항원 농도 감소가 유지되는 경우는 없었다 [4]. 1997년부터는 국내에서도 ZDV, Lamivudine (3TC) 및 Indinavir (IDV)로 된 삼제요법이 도입되어 말기 AIDS 환자의 예후가 크게 향상되고 있으나 [5] 효과적인 HIV 감염자 치료를 위해서는 CD4+ 세포수 측정과 함께 약제에 대한 내성 검사가 이루어지는 것이 필수적이다. 본고에서는 국내에서 처음으로 지도부딘 복용에 따른 내성 관련 돌연변이 빈도를 nested PCR 한 후 direct sequencing을 통해 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 환자

1987년부터 1993년 4월까지 HIV-1 감염자로 진단받은 27명을 대상으로 하였으며 성별은 여자 4명, 남자 23명이다. 진단 연도별로는 1987년부터 1993년까지 연도별로 2, 2, 4, 6, 4, 7 및 2명이다. 거의 모두 6개월마다 주기적으로 CD4+ 세포수가 측정되었다 [7]. ZDV를 복용한 27명의 최종 genotyping 시점의 CD4+ 세포수 분포는 500/μl 이상이 2명, 200~500/μl이 11명, 200/μl 이하가 14명이었다. 27명 중 1명만 ZDV 복용 전의 검체가 있어 genotyping이 이루어졌다 (22-9307, Table 2).

2. ZDV 복용기간 및 CD4+ 세포수 변화

ZDV 복용기간은 3개월에서 79개월까지로 다양하였으며 복용량은 하루 300 mg에서 1000 mg이었으나 대부분은 하루 300~500 mg을 복용하였고 환자 5와 17은 하루 800 mg씩을 복용하였다. 각 환자에서 ZDV를 처음 복용하기 시작한 시점으로부터 최종 genotyping이 된 시점까지의 기간

은 46.3 ± 26 개월 (평균 \pm 표준편차) 이었다. 이 기간 동안 실제 ZDV를 복용한 기간은 27.3 ± 16.3 개월 (중앙값; 25개월, 범위; 3~79개월)로 기간 대비 복용율은 약 59%였다. 46.3 ± 26 개월 동안 CD4+ 세포수는 $230 \pm 117/\mu\text{l}$ 에서 $152 \pm 162/\mu\text{l}$ 로

연평균 $20/\mu\text{l}$ 개 감소하였다. 27명 중 환자 19와 25는 ddI를 ZDV와 함께 6개월 미만 복용한 적이 있었고 (Table 2), 27명 모두 이미 발표한 바와 같이 [6] ZDV 복용 시작 이후에 고려홍삼을 하루 5.4g씩 복용하였거나 복용 중이었다 (범위; 2~47개

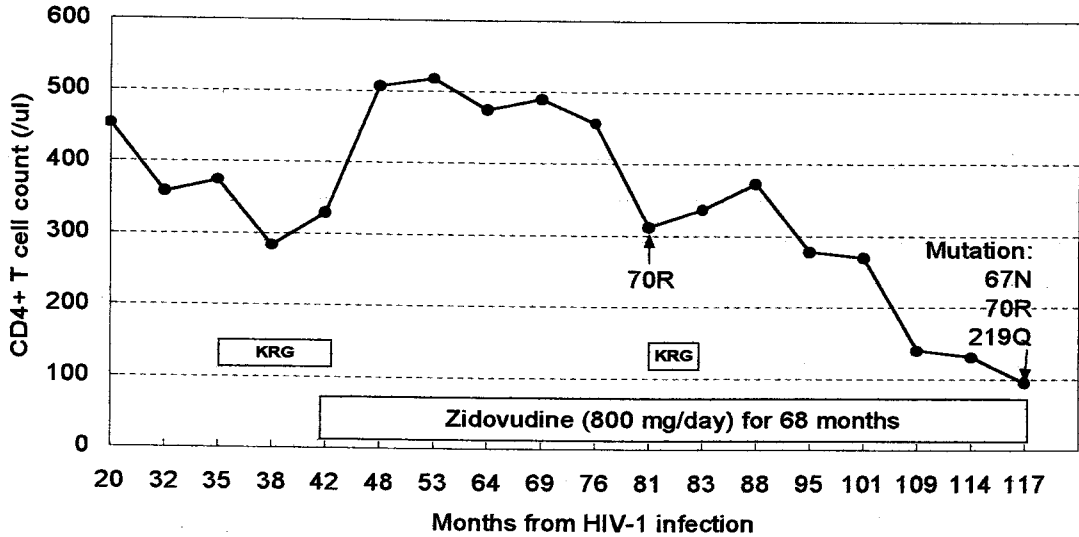


Figure 1. Development of mutation to ZDV in reverse transcriptase and decrease in CD4+T cell. The patient (24 years old in 1999) was infected with HIV-1 via blood transfusion in November 1989. Since April 1993 (month 42), he has been treated with ZDV (800 mg/day). He also took Korean red ginseng (KRG) for 8 months (total 1,320 g). PBMC samples at months 81 and 117 were available for this study.

Incidence of RT mutation

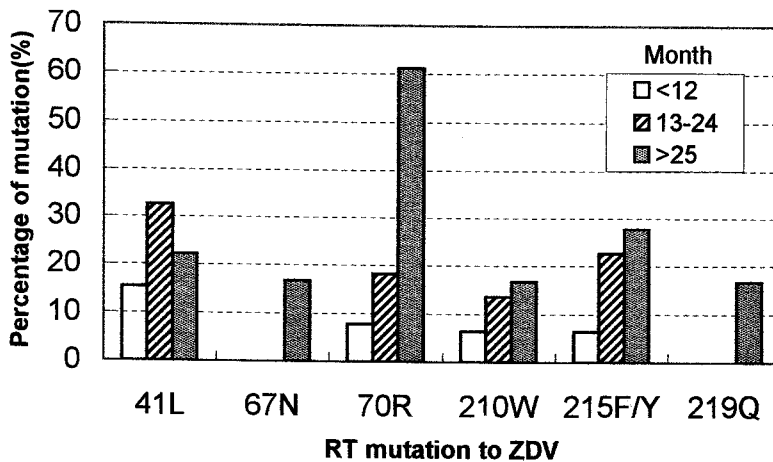


Figure 2. Incidence of mutation to zidovudine (ZDV) in reverse transcriptase (RT) by codon and month of therapy in 27 Korean HIV-1 infected patients treated with ZDV. Incidence of 70R, 210W and 215F/Y increased according to the duration of therapy. 67N and 219Q appeared simultaneously after 2 years therapy in 3 patients.

Table 1. Changes in amino acid in reverse transcriptase (RT) associated with resistance to azidothymidine therapy.

Position at RT	Amino acid change	Codon change	Fold resistance
40	M40L	ATG to TTG	4
		or CTG	4
67	D67N	GAC to AAC	
70	K70R	AAA to AGA	8
210	L210W	TTG to TGG	0
215	T215F	ACC to TTC	16
		ACC to TAC	16
219	K219Q	AAA to CAA	

월, 중앙값; 17개월).

3. Nested PCR을 이용한 DNA 증폭

1993년 6월부터 CD4+ 세포수 측정시 바이러스 배양을 위해 sodium heparin 튜브 (10 ml)로부터 분리한 말초혈액단핵구 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC)를 2개의 cryotube에 나누어 deep freezer에 보관해왔다. 이 중 하나를 녹여 원심분리한 후 세포 침전물을 포함하여 약 200 µl를 남기고 상층액은 버렸다. 남긴 200 µl를 homogenization 후 10 µl을 95℃에서 10분간 가열하여 denature 시킨 후 이를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

첫 PCR은 primers JA99 (5'-GGGGGAATTGG-AGGTTTTATCAAAG-3'; 2394-2418)와 RIT137 (5'-TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC-3'; 3301-3325)를 사용하여 RT codon 1에서 219까지를 포함하는 931 base pairs (bp)를 증폭하였다 [30]. 일차 증폭산물을 이용한 2차 PCR은 RT codons 41, 67 및 70을 포함하는 전반부 (257 bp; codon 13-98)와 codon 210, 215 및 219를 포함하는 후반부 (319 bp; codon 152-259)로 나누어 실시하였다. 전반부를 위한 primers는 523 (5'-AAGCCAGGAATGGAT-3'; 2586-2603)과 526 (5'-TGCAGGATGTGGTATT-CCTAA-3'; 2824-2843)였고 후반부를 위한 primers는 527 (5'-GGATGGAAAGGATCACCAGCAATA-3'; 3003-3026)와 530 (5'-CCCATCCAAAGGAATG-GAGGTTCT-3'; 3202-3225) 이었다. 상기한 primers의 numbering은 HIV NL 43을 기준으로 하였다.

PCR cycling은 PCR Sprint (HYBAID, UK)를 이용하여 1차 PCR은 95℃에서 3분간 denature 후, 94℃에서 30초, 50℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분으로 30회 반복하였다. PCR 반응은 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM each dNTP, 20 pmol of each primer, 1.25 Units AmpliTaq polymerase (Perkin-Elmer Cetus), 그리고 denatured PBMC (DNA) 10 µl를 넣어 반응 총량을 50 µl로 하였다. 2차 PCR은 1차 산물 5 µl를 사용하였고 조건은 전반부 (primers 523/526)를 위해서 annealing temperature를 58℃, 후반부 (primers CE7/RIT137)를 위해서는 64℃에서 반응시킨 것을 제외하고는 1차 PCR 때와 동일하였다. 2차 PCR 산물은 1.5% agarose gels에서 ethidium bromide staining으로 확인하였다.

4. Direct sequencing

2차 PCR 산물 7 µl를 이용하여 direct sequencing을 실시하였다. Sequencing primers는 전반부를 위해서는 primer 523를, 후반부를 위해서는 primer CE7를 사용하였다. Sequencing reactions은 T7 sequenase v2.0 (Amersham Life Science, USA)를 사용하였다.

결 과

국내 HIV-1 감염자들에게서 ZDV에 대한 내성 유전자 발현 정도를 조사하고자 ZDV를 복용한 적이 있는 27명의 HIV-1 감염자들로부터 분리된 말초혈액단핵구를 검체로 사용하였다. HIV-1의 역전사효소 (reverse transcriptase; RT)를 구성하는 560개의 아미노산 중 내성과 관련 있는 41-219 부위를 증폭하기 위해 nested PCR을 실시하였다. 2차 PCR은 41L, 67N 및 70R과 210L, 215F/Y 및 219Q를 각각 3개씩 탐지할 수 있게 전반부 257 bp와 후반부 319 bp로 나누어 PCR을 한 후 직접 염기서열을 결정하였다. 그러나 총 56건의 검체 중 전반부 1건 (08-9409)에 대해서는 2차 PCR에서 증폭산물을 얻을 수 없었다 (동일한 검체에 대해 각기 다른 PCR 산물로 2회 염기서열이 결정된 2개 포함; 19812와 22-9410, Table 2). 내성이 나타나는 부위로 알려진 6곳의 wild type (WT) nucleotides와 아미노산 그리고 내성 돌연변이는 Table 1과 같다.

Table 2. Genotypic analysis of reverse transcriptase (RT) in 27 Korean HIV-1 infected patients treated with zidovudine (ZDV) and Korean red ginseng for 46 ± 26 months.

Patient code-date	Months with ZDV / duration ^a	Wild type codons in RT						CD4+ T cell count at the time of (/μl)		Months ^b without ZDV
		41 M	67 D	70 K	210 L	215 T	219 K	ZDV start	Genotyping	
01-9409	10 / 27	-	-	-	-	-	-	272	158	4
-9608	16 / 38	-	-	-	-	-	-		95	0
-9611	19 / 53	-	-	R	-	-	-		122	0
-9812	21 / 78	-	-	-	-	-	-		29	6
-9812	21 / 78	-	-	-	W	Y	-		29	6
02-9503	24 / 40	-	-	R	-	-	-	291	105	0
-9601	39 / 59	-	N	R	-	Y	Q		4	0
03-9908	25 / 102	-	-	-	-	-	-	167	130	76
04-9707	40 / 76	L	N	-	W	Y	Q	327	1	12
05-9408	17 / 42	-	-	-	-	-	-	219	171	14
-9702	25 / 72	-	-	-	-	-	-		162	4
06-9307	6 / 8	-	-	-	-	-	-	236	247	0
-9412	8 / 17	-	-	-	-	-	-		6	7
07-9504	15 / 19	-	-	-	-	-	-	124	69	8
-9511	22 / 26	L	-	-	-	-	-		7	1
08-9310	8 / 11	-	-	R	-	-	-	209	203	0
-9409	11 / 22	/	/	/	-	-	-		79	0
-9509	25 / 33	-	-	R	-	-	-		58	0
09-9306	6 / 6	-	-	-	-	-	-	177	396	0
10-9706	8 / 18	-	-	-	-	-	-	70	84	3
-9903	20 / 39	L	-	-	-	Y	-		8	0
11-9307	24 / 24	-	-	R	-	-	-	320	274	0
12-9904	3 / 78	-	-	-	-	-	-	365	292	74
13-9309	13 / 35	-	-	-	-	-	-	198	411	0
-9408	14 / 46	-	-	-	-	-	-		397	0
-9612	40 / 64	-	-	R	-	-	-		189	0
14-9306	26 / 26	-	-	R	-	-	-	131	226	0
15-9306	27 / 27	-	-	R	-	-	-	378	368	0
16-9312	21 / 21	-	-	-	-	-	-	136	330	0
-9408	29 / 29	-	-	-	-	-	-		427	0
17-9608	43 / 43	-	-	R	-	-	-	284	312	0
-9908	79 / 79	-	N	R	-	-	Q		95	0
18-9412	36 / 36	-	-	R	-	-	-	350	600	0
19-9706	5 / 5	-	-	-	-	-	-	72	58	0
20-9504	30 / 34	L	-	-	-	Y	-	176	55	3

Table 2. Genotypic analysis of reverse transcriptase (RT) in 27 Korean HIV-1 infected patients treated with zidovudine (ZDV) and Korean red ginseng for 46±26 months.

Patient code-date	Months with ZDV / duration ^a	Wild type codons in RT						CD4+ T cell count at the time of (μl)		Months ^b without ZDV
		41 M	67 D	70 K	210 L	215 T	219 K	ZDV start	Genotyping	
21-9411	15 / 18	-	-	-	-	-	-	186	207	0
-9702	33 / 57	-	-	R	-	-	-		72	0
22-9307	0	-	-	-	-	-	-	179	346	0
-9410	7 / 7	L	-	-	-	-	-		388	0
-9410	7 / 7	L	-	-	W	Y	-		388	0
-9505	14 / 14	L	-	-	W	Y	-		224	0
-9604	22 / 25	L	-	-	W	Y	-		35	0
-9609	27 / 30	L	-	-	W	Y	-		4	0
23-9310	17 / 17	L	-	-	-	Y	-	50	53	0
-9509	39 / 39	L	-	-	W	Y	-		6	0
24-9312	11 / 17	-	-	-	-	-	-	241	161	3
-9406	14 / 23	L	-	-	-	-	-		236	0
-9701	16 / 54	L	-	-	-	-	-		96	0
25-9611	12 / 51	-	-	-	-	-	-	348	228	0
-9808	17 / 72	-	-	-	-	-	-		63	10
26-9406	14 / 26	-	-	R	-	-	-	581	606	0
-9609	41 / 53	-	-	R	-	-	-		298	0
-9804	60 / 72	-	-	R	-	-	-		342	0
27-9312	4 / 8	-	-	-	-	-	-	135	133	2
-9405	9 / 15	-	-	-	-	-	-		172	0
-9411	15 / 19	-	-	-	-	-	-		219	0

Duration^a means actual period from the start of ZDV therapy. Months^b from the last ZDV intake to genotyping. Hyphen means wild type. Slash means that the second PCR was negative.

1. 복용기간에 따른 내성 돌연변이 빈도

실제로 ZDV를 복용한 개월수에 따른 부위별 내성 빈도는 복용 3~12개월째인 11명으로부터 얻어진 15건의 검체 중 전반부 14건 (08-9409 제외)과 후반부 15건이 증폭되었다. 이 중 M41L 2건 (동일한 검체에 대한 2회 PCR 성적임)과 70R, 210W, 215Y이 각각 1회씩만 탐지되었다 (Table 2). 처음으로 내성 관련 돌연변이가 나타난 경우는 환자 22에서 ZDV 복용 7개월째 M40L이었다 (Table 2). 그러나 이 때는 동일한 검체에 대해 별도의 2회 PCR과 염기서열 결정으로 이루어졌는

데 내성 돌연변이로서 한 번은 M41L만 나타났고 또 다른 한 번은 M41L과 L210W, T215Y로 mixed type을 보였다. 이 때 탐지된 41L의 nucleotides는 유일하게 CTG였으며 이후에는 모두 TTG였다.

ZDV 복용 13~24개월째에 채혈된 21 검체를 대상으로 한 22건에서 M41L과 K70R가 각각 7건 (32.5%)과 4건 (18.2%) 탐지되었고, T215F/Y와 L210W가 22건 중 각각 5건 (22.7%)과 3건 (13.6%)씩 탐지되었다 (Figure 2). 환자 24-9312에서는 23개월과 54개월 추적검사 동안 실제 ZDV를 각각 14개월 및 16개월 복용한 상태에서 다른 돌연변이 없이 41L만이 2회 연속으로 탐지되었다. 210W

는 ZDV 복용 14개월째 환자 22-9505에서 처음으로 탐지되었다.

ZDV를 25개월 이상 복용한 환자 16명으로부터 얻은 18개의 검체 중 12개월 이상 ZDV 복용을 중단한 상태였던 환자 3-9908와 5-9702을 제외한 모든 검체에서 적어도 한 개 이상의 내성 돌연변이가 있었으며 부위별 빈도는 70R, 215F/Y, 41L이 각각 11건 (61.1%), 5건 (27.8%), 4건 (22.2%) 이고, 67N, 210W 및 219Q은 각각 3건씩 (16.7%) 탐지되었다 (Table 2, Figure 2). 이들의 실제 ZDV 복용율은 follow up 기간 51.7±22개월 동안 36.9±14개월 복용하여 기간 대비 약 71.4%였다.

2. 내성 탐지 순서

M41L이 최초로 탐지된 환자 22에서 ZDV 복용 초기 6개월 이내에 얻어진 검체를 대상으로 조사가 이루어지지 못한 제한점이 있으나 본 연구 대상 검체 중 가장 먼저 탐지된 돌연변이는 M41L, 210W과 215Y이 ZDV 복용 7개월째 (22-9410), K70R이 8개월째 (08-9310), 그리고 219Q와 67N이 각각 39개월째였다 (02-9601, Table 2).

3. 215F/Y 유무에 따른 예측

215F/Y는 7명에서 탐지되었고 탐지시 CD4+ 세포수는 22-9410와 22-9505를 제외하고는 55/μl 이하의 말기 AIDS 환자였다. 그리고 환자 22에서도 215Y가 나타난 22-94.10에서 22-96.09까지 23개월 동안 CD4+ 세포수가 388/μl에서 5/μl로 빠른 속도로 감소하였다. 219Q가 탐지된 3명 (2-9503, 4-9707, 17-9908, Table 2)도 모두 CD4+ 세포수가 100/μl 이하인 환자였다. 예외적으로 고용량인 하루 800mg씩 ZDV를 지속적으로 복용해서 가장 잘 CD4+ 세포수가 유지되어 온 환자인 17의 경우는 복용 전 3개월째 CD4+ cell이 284/μl (17.0%) 이던 것이 ZDV 복용으로 장기간 400/μl으로 유지되다가 결국은 100/μl 이하로 감소하였다. 처음으로 genotyping이 실시된 감염 후 81개월째에 70R이 나타났고 ZDV 복용 76개월째인 감염 후 117개월째인 두번째 genotyping에서는 내성 돌연변이 D67N, K70R 및 K219Q가 탐지되었다 (Figure 1). ZDV를 복용한 환자들에서 내성 mutation 수가 2개 이상인 때 (N=12)의 CD4+ 세포수는 74±117/μl로 내성 mutation이 없거나 1개인 때 (N=42)의 세포수 220±146/μl에 비해 유의하게 낮았다 (p<0.01).

4. 내성 발현이 전혀 없는 환자들

ZDV를 복용한 27명 중 내성 관련 돌연변이 여섯 부위 중 한 곳에서도 mutation이 없는 경우는 9명이었다. 환자 3, 4, 5, 6, 12 및 25는 genotyping 시 약물 복용을 중단한 지 오래된 경우 (7~77개월) 이며 장기간에 걸쳐 CD4+ 세포수 감소를 보이고 있다. 환자 19-9706와 25-9611는 일시적으로 ddI를 복용한 적이 있으나 역시 CD4+ 세포수 감소를 보이고 있다. 환자 9-9306, 16-9408, 및 27-9312은 모두 immune complex dissociated (ICD) p24 항원 농도가 ZDV 복용 전 이미 100 pg/ml 이상의 high replication 상태로 각각 ZDV 복용 6개월, 15개월 및 29개월째로 CD4+ 세포수는 복용 전에 비해 증가한 상태였다. 특히 환자 9, 16 및 27은 홍삼을 철저히 복용한 환자들로 각각 ZDV 복용 6, 19 및 30개월째였다.

고 찰

AIDS에 대한 많은 연구에도 불구하고 아직도 AIDS 백신 개발에 대한 희망적인 연구 결과가 없는 실정이다. 따라서 현실적으로 HIV 감염자를 위해서는 효과적인 antiretroviral agents를 복용하여 viral load를 탐지 수준 이하로 감소시켜 면역능을 유지하는 것이 최선의 치료 목표가 되고 있다. 1990년 이후 여러 가지 치료제들이 개발되어 광범위하게 사용되고 있어 이들 치료제에 대한 내성 문제에 대한 연구가 1990년 이후 활발히 이루어지고 있다. 최근에는 단백분해효소억제제 (protease inhibitors)에 대한 내성도 protease에서 mutation이 순서적으로 축적되어 일어나는 것으로 보고되고 있으며 [23,25] 나아가 ZDV와 ddC (zalcitabine) 혹은 ZDV와 didanosine (ddI)을 장기간 병용한 환자에서 Q151M을 포함한 5개의 RT 돌연변이 세트 [A62V, V75I, F77L, F116Y]가 multidideoxynucleoside resistance (MDR)를 전달하는 것으로 보고되기까지 한다 [15]. 심지어 외국에서는 이러한 치료를 받지 않은 환자에서 내성을 나타내는 바이러스주의 발견이 점차 증가하고 있다. 실제 T215F/Y의 빈도가 1988~1991년 분리주에서는 1.4%, 1992년 7.2%, 1993~1994년 10.4% 및 1989~1996년에는 12.8%였으며 1995~1996년에 분리된 바이러스에서는 42%까지 증가하였다 [31]. 이는 장차 ZDV를 전혀 복용한 적이 없는 감염자가 이

미 ZDV에 내성을 가지고 있을 확률이 점차 증가하고 있음을 의미한다. 다행히 국내에서는 1993년 4월 이전에 HIV-1감염 진단을 받은 환자들 중 ZDV를 복용하지 않은 30명에서는 지금까지 알려진 RT 억제제에 내성을 나타내는 mutation이 없었다 (미발표).

이러한 약제들에 대한 내성 유무를 평가하는 방법에는 phenotypic assay와 genotypic assay가 있는데 전자는 바이러스 배양을 전제로 하므로 P2 내지 P3 biosafety level의 시설과 많은 노동력을 필요로 하고 고비용과 재현성의 문제 등으로 지속적으로 유지하기가 쉽지 않다. 반면 후자는 약 3가지 방법이 있는데 우선 알려진 내성 부위에 대해 각각 wild type과 mutation을 가진 두 조의 primers로 환자의 해당 핵산이 증폭되는지를 판단하여 결정하는데 [2,19,21] 이는 간편은 하나 새로운 novel mutation을 탐지할 수는 없는 단점이 있다. 둘째와 셋째는 핵산을 대개 nested PCR로 증폭하고 sequencing 하여 결과를 얻는데 PCR 산물로부터 direct sequencing 하는 것이 cloning을 해서 sequencing 하는 것보다 간편할 뿐만 아니라 selection biases가 적어 내성 관련 연구를 위해서는 가장 많이 이용되는 방법이다 [28]. 본고에서는 국내 환자를 대상으로 하여 direct sequencing 방법으로 RT를 구성하는 아미노산 1번부터 219번까지에 해당하는 nucleotides sequences를 결정하여 ZDV를 장기간 복용한 환자들에서 genotypic resistance를 조사하였다.

ZDV 단독으로는 장기간 치료에 따른 효과를 기대하기 어려움에도 불구하고 ddI, ddC, 및 3TC 중 하나와 norvir, indinavir 및 invirase 등의 protease inhibitors 중 한 가지와 소위 삼제요법제의 하나로 널리 사용되고 있다 [9,12]. ZDV의 내성 발현 빈도는 연구자에 따라 차이가 있으나 2년간 복용시 70R과 215F/Y는 각각 약 75%와 68%에서, 67N과 219Q은 약 58% 및 40%에서 발생한다 [27].

일반적으로 가장 먼저 나타나는 돌연변이인 70R의 경우는 본 연구에서 ZDV 복용기간이 길어질수록 발생률이 증가하여 2년 이상 복용한 환자 검체에서 66.7%였고, 26개월 이상 복용한 모든 검체 중 2개 이상의 돌연변이를 가진, 다시 말해 215F/Y를 가진 4개의 검체를 제외한 모든 검체에서 탐지되었다. 그러나 두 개 이상의 돌연변이를 가진 9개의 검체 중 환자 2-9601를 제외한 나머지에서는 전혀 탐지되지 않았다. 내성 돌연변이로서

약 8배의 내성을 갖는 70R이 단독으로 존재하는 CD4+ 세포수 감소와는 별 관련성이 없었다.

가장 안정된 돌연변이로 ZDV 내성과 관련해서 주된 역할을 하는 215F/Y가 있을시 WT에 비해 약 16배의 내성 증가를 초래한다 [16,20]. 따라서 본 연구에서도 215F/Y가 탐지된 6명에서는 CD4+ 세포수가 탐지되지 않은 환자들의 경우보다 유의하게 적었다 ($p < 0.01$).

가장 최근 보고된 L210W는 내성과 관련하여서는 아직 논란이 있으며, 실제 단독으로 존재하는 내성을 보이지 않는다. 그러나 연구자에 따라 41L 및 215F/Y와 함께 발현시 41L과 215F/Y 둘만 있는 것에 비해 약 2~4배 [11] 내지 370배 정도 [13]의 내성을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 210W는 반드시 41L과 함께 나타나는데 [26] 본 연구에서도 4건 모두 41L과 동반하여 나타났다. 그리고 나타나는 시기도 215F/Y와 41L이 나타난 후로 알려져 있으며 [13] 실제 환자 23-9310에서 이러한 사실이 확인되었다. 그리고 41L은 본 연구 대상자 중 6명에서 탐지되었고, 다른 부위의 내성 돌연변이 없이 단독으로 존재하지는 않는 것으로 알려져 있으나 [29] 환자 22와 24에서는 41L만이 탐지된 시점이 있었다.

본 연구 대상자들에서의 내성 빈도 발현은 가장 흔히 비교가 되는 돌연변이인 215F/Y 기준으로 보면 2년 이상 복용한 외국의 발표들 (45%, 68%, 89~100%) [3,17,27] 보다 아주 낮은 26.9%였다. 이러한 성적에 영향을 준 것으로 고려해볼 수 있는 요인으로는 첫째, 일부에서 ZDV를 지속적으로 복용하지 않고 몇 개월씩 중단했다가 다시 복용하여 follow up 기간 대비 복용율이 60%로 낮아 genotyping 시점 직전에 수 개월씩 중단 상태에 있었던 환자가 있었던 점, 둘째, 국내에서 사용된 ZDV 용량이 외국의 600~1000 mg 보다 낮은 하루 300~500 mg였던 점을 들 수 있다. 첫째와 둘째 요인에도 불구하고 평균 46개월 동안 CD4+ 세포수가 $230 \pm 117/\mu\text{l}$ 에서 $152 \pm 162/\mu\text{l}$ 로 연간 20개씩 감소하여 기존의 발표 (연간 39/ μl 감소) [8]에 비해 현저히 느리게 감소한 것은 고려홍삼을 장기 복용으로 인한 효과가 아닌가 사료된다.

실제로 치료제를 복용하다가 중단하게 되면 mutations을 가진 바이러스에서 WT으로의 reversion이 대부분의 환자에서 9~18개월 후 일어나는데, 이는 해당 약물의 selective pressure가 없는 상황에

서는 survival fitness가 보다 나은 WT strain이 dominant population이 되기 때문이다 [1]. 5-9702에서 장기간 ZDV를 복용하였음에도 내성이 전혀 나타나지 않은 것은 genotyping 직전 4~5개월간 ZDV를 복용하지 않은 데 기인한 것으로 이해할 수도 있다. 그러나, 4-9707에서처럼 12개월 동안 ZDV를 복용하지 않았어도 내성 돌연변이가 유지 되는 것을 볼 수 있었고, ZDV를 복용하다가 ZDV를 중단하고 ddI, 3TC와 IDV로 triple therapy를 2년 이상 받은 다른 환자에서도 ZDV에 대한 내성 돌연변이가 2년 이상 지난 시점에서 확인되는 경우도 있었다. 본 연구에서 제시된 자료로는 높은 바이러스 항원을 가진 환자 14-9306에서 26개월째 215F/Y가 나타나지 않았고, 실제로는 67개월째에 215F가 나타나기 시작하여 (미발표) 지금까지 문헌상 가장 오랫동안 215F/Y가 나타나지 않은 기간인 240주 [22] 보다 길었다.

본 연구는 국내에 도입된 항바이러스 치료제에 대한 내성과 관련한 첫 유전적인 분석 자료로서 외국에서 보고된 RT상의 6부위에서의 모든 종류의 돌연변이가 관찰되었으며, genotyping 성적이 CD4+ 세포수 감소와 잘 일치하였다. 특히 2개 이상의 돌연변이를 갖는 경우에는 매우 나쁜 예후를 보였다. 따라서 본 연구에서 적용한 방법의 genotyping으로 얻은 성적은 치료제를 선택하거나 바꾸는데 이용될 수 있고 또한 ddI나 3TC 같은 다른 RT 억제제들에 대한 내성 유무도 판정할 수 있어 앞으로 국내에서 널리 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

본 연구는 ZDV에 대한 내성 발현 정도를 HIV-1의 reverse transcriptase의 일부 염기서열 결정을 통해 내성 관련 돌연변이 (mutations)의 빈도를 국내 감염자를 대상으로 처음으로 조사하였다. 연구 대상으로한 환자 27명에서 처음 ZDV 복용 시점부터 최종 검사 시점까지 46.3 ± 26 개월이었지만 실제 ZDV 복용기간은 27.3 ± 16.3 개월이었다. 외국에서보다 ZDV 복용 용량이 상대적으로 낮았음에도 CD4+ 세포수 감소는 약 4년 동안 $230 \pm 117/\mu\text{l}$ 에서 $152 \pm 162/\mu\text{l}$ 로 연평균 $20/\mu\text{l}$ 개 정도의 느린 감소를 보였다. 그리고 이들에서의 실제 ZDV에 대한 내성 돌연변이 빈도는 외국의 보고보다 낮았으며 6곳의 내성 부위 중 감수성 저하를 가장 많

이 가져오는 215Y/F의 빈도는 12개월 이하에 6.7%, 13~24개월에서는 22.7% 및 25개월 이상에서는 27.8%였다. 27명 중 9명에서는 내성 돌연변이가 없었는데 검사된 것 중 가장 오랫동안 내성을 보이지 않은 경우는 29개월째였다.

외국의 보고와는 달리 ZDV를 25개월 이상 지속적으로 복용해온 환자들 (9명)에서 CD4+ 세포수의 뚜렷한 감소가 없었으며 70R 이외의 다른 mutation이 추가로 나타나지 않았는데 앞으로 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 아산생명과학연구소의 99년도 연구비 지원 (과제번호 99-062)에 의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

- 1) Albert J, Wahlberg J, Lundeberg J, Cox S, Sandstrom E, Wahren B, Uhlen M: Persistence of azidothymidine-resistant human immunodeficiency virus type 1 RNA genotypes in posttreatment sera. *J Virol* **66**: 5627-5630, 1992.
- 2) Boucher CAB, O'Sullivan E, Mulder JW, Ramautarsing C, Kellam P, Darby G, Lange JMA, Goudsmit J, Larder BA: Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J Infect Dis* **165**: 105-110, 1992.
- 3) Boucher CAB, Tersmette M, Lange JMA, Kellam P, de Goede REY, Mulder JW, Darby G, Goudsmit Jaap, Larder BA: Zidovudine sensitivity of human immunodeficiency viruses from high-risk, symptom-free individuals during therapy. *Lancet* **336**: 585-590, 1990.
- 4) Cho YK, Kim YK, Shin YO, Cho YJ: Change of serum β_2 -microglobulin, p24 antigen and CD4+ T lymphocyte in persons with human immunodeficiency virus infection after azidothymidine treatment. *Korean Journal of Infectious Diseases* **25**: 211-219, 1993.
- 5) Cho YK, Kim YK, Oh WI, Cho GJ: CMV Infection in AIDS patients depends on the decrease of CD4+ T cell count. *J Korean Soc Virology* **28**: 359-368, 1998.
- 6) Cho YK, Kim YK, Lee I, Choi MH, Shin YO: The effect of Korean red ginseng (KRG), zido-

- vudine, and the combination of KRG and ZDV on HIV-infected individuals. *J Korean Soc Microbiol* **31**: 353-360, 1996.
- 7) **Cho YK, Lee HJ, Kim YB, Oh WI, Kim YK**: Sequence analysis of C2-V3 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 and its correlation with clinical significance; the effect of long-term intake of Korean red ginseng on *env* gene variation. *J Korean Soc Microbiol* **32**: 611-623, 1997.
 - 8) **Cho YK, Choi BS, Kim YB, Cho GJ, Kang C, Kim SS, Kee MK, Hur SJ, Kim TS, Cho YJ, Shin YO**: CD4+ T lymphocyte, β_2 -microglobulin and p24 antigen level in HIV infected persons. *Korean Journal of Infectious Diseases* **25**: 139-149, 1993.
 - 9) **Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, Bassett RL, Timpone J, Baruch A, Jones M, Fahey K, Whitacre C, McAuliffe VJ, Friedman HM, Merigan TC, Reichman RC, Hooper C, Corey L**: Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. *N Engl J Med* **334**: 1011-1018, 1996.
 - 10) **Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, Jackson GG, Durack DT, King D**: The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of subjects with AIDS and AIDS-related complex-A double-blind placebo-controlled trial. *N Engl J Med* **317**: 185-191, 1987.
 - 11) **Harrigan PR, Kinghorn I, Bloor S, Kemp SD, Najera I, Kohli A, Larder BA**: Significance of amino acid variation at human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase residue 210 for zidovudine susceptibility. *J Virol* **70**: 5930-5934, 1996.
 - 12) **Hogg RS, O'Shaughnessy MV, Gataric N, Yip B, Craib K, Schechter MT, Montaner JSG**: Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals. *Lancet* **349**: 1294, 1997.
 - 13) **Hooker DJ, Tachedjian G, Solomon AE, Gurusnghe AD, Land S, Birch C, Anderson JL, Roy BM, Arnold E, Deacon NJ**: An in vivo mutation from leucine to tryptophan at position 210 in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to high-level resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J Virol* **70**: 8010-8018, 1996.
 - 14) **Ioannidis JPA, Cappelleri JC, Skolnik PR, Melville B, Chalmers TC, Sacks HS**: Early or deferred zidovudine therapy in HIV-infected patients without an AIDS-defining illness. *Ann Int Med* **122**: 856-866, 1995.
 - 15) **Kavlick MF, Wyvill K, Yarchoan R, Mitsuya H**: Emergence of Multi-dideoxynucleotide-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants, viral sequence variation, and disease progression in patients receiving antiretroviral chemotherapy. *J Infect Dis* **98**: 1506-1513, 1998.
 - 16) **Kellam P, Boucher CAB, Larder BA**: Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contribute to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1934-1938, 1992.
 - 17) **Kozal MJ, Shafer RW, Winters MA, Katzenstein DA, Merigan TC**: A mutation in human immunodeficiency virus reverse transcriptase and decline in CD4 lymphocyte numbers in long-term zidovudine recipients. *J Infect Dis* **167**: 526-532, 1993.
 - 18) **Larder BA, Coates KE, Kemp SD**: Zidovudine resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture. *J Virol* **65**: 5232-5236, 1991.
 - 19) **Larder BA, Darby G, Richman DD**: HIV with deduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**: 1731-1734, 1989.
 - 20) **Larder BA, Kellam P, Kemp SD**: Zidovudine resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from HIV-infected lymphocytes. *AIDS* **5**: 137-144, 1991.
 - 21) **Larder BA, Kemp SD**: Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* **246**: 1155-1158, 1989.
 - 22) **Leal M, Rey C, Torres Y, Relimpio F, Pino R, Lissen E, Sa'nchez-quijano A, Luque F**:

- Rate of development of mutation at codon 215 of HIV-1 reverse transcriptase and its predictive factors at the time of initiation of zidovudine therapy. *European J Clinical Investigation* **26**: 476-480, 1996.
- 23) **Lech WJ, Wang G, Yang YL, Chee Y, Dorman K, McCrae D, Lazzeroni LC, Erickson JW**: In vivo sequence diversity of the protease of human immunodeficiency virus type 1: Presence of protease inhibitor resistant variants in untreated subjects. *J Virol* **70**: 2038-2043, 1996.
- 24) **Mayers DL**: Prevalence and incidence of resistance to zidovudine and other antiretroviral drugs. *Am J Med* **102(5B)**: 70-75, 1997.
- 25) **Molla A, Koneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo HM, Markowitz M, Chernyavskiy T, Niu P, Lyons N, Hsu A, Granneman GR, Ho DD, Boucher CAB, Leonard JM, Norbeck DW, Kempf DJ**: Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nature Medicine* **2**: 760-766, 1996.
- 26) **Orlandi P, Cancrini C, Scaccia S, Romiti ML, Livadiotti S, Gattinara GC, Angelini F, Cox S, Rossi P**: Analysis of HIV-1 reverse transcriptase gene mutations in infected children treated with zidovudine. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **19**: 230-237, 1998.
- 27) **Richman DD, Guatelli JC, Grimes J, Tsiatis A, Gingeras T**: Detection of mutations associated with Zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use of polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **164**: 1075-1081, 1991.
- 28) **Schmit JC, Weber B**: Recent advances in antiretroviral therapy and HIV infection monitoring. *Intervirology* **40**: 304-321, 1997.
- 29) **Unal A, Lorenzo E, Brown M, Smith L, Matsuura S, Scott G, Scott W**: Reverse transcriptase mutations in HIV-1 infected children treated with zidovudine. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **13**: 140-145, 1996.
- 30) **Wahlberg J, Fiore J, Angarano G, Uhlen M, Albert J**: Apparent selection against transmission of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus 1 variants. *J Infect Dis* **169**: 611-614, 1996.
- 31) **Wainberg MA, Friedland G**: Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *JAMA* **279**: 1977-1983, 1998.
- 32) **Yarchoan R, Weinhold KJ, Lyerly HK, Gelmann E, Blum RM, Shearer GM, Mitsuya H, Collins JM, Myers CE, Klecker RW, Markham PD, Durack DT, Lehrman SN, Barry DW, Fischl MA, Gallo RC, Bolognesi DP, Broder S**: Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV III/LAV replication to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* **i**: 575-580, 1986.