

Lamivudine 복용 HIV-1 감염자에게서 내성 돌연변이 검색

울산대학교 의과대학 미생물학교실¹, 임상병리학교실², 부산대학교 의과대학 내과학교실³,
가톨릭대학교 의과대학 내과학교실⁴

조영걸¹ · 성흥섭^{1,2} · 이희정¹ · 김유겸¹ · 지현숙² · 조군제³ · 강문원⁴

=Abstract=

Detection of Resistance Mutation to Lamivudine in HIV-1 Infected Patients

Young-Keol Cho¹, Heung-Sup Sung^{1,2}, Hee-Jung Lee¹, Yoo-Kyum Kim¹, Hyun-Sook Chi²
Goon-Jae Cho³ and Moon-Won Kang⁴

Department of Microbiology¹ and Clinical Pathology², University of Ulsan College of Medicine, Department of Internal Medicine, Pusan National University Hospital³, Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College⁴

To investigate resistance to lamivudine (3TC), we examined the incidence of M184V in 20 HIV-1 patients treated with 3TC for 13.1 ± 9 months. Fourteen of 20 patients had been exposed to zidovudine (ZDV) or didanosine (ddI) prior to 3TC therapy. Nested PCR targeting to reverse transcriptase (RT) and direct sequencing were performed for peripheral blood mononuclear cells sampled serially. There were resistance mutations to ZDV in at least 9 patients at baseline, although there was no resistance mutation to 3TC. We could detect M184V in 6 (30%) out of 20 patients. The incidence of M184V increased as the duration of therapy prolongs (13% in samples <12 months; 47% in samples ≥ 12 months). The frequency of mutation M184V was higher in patients with previous mutation to ZDV than in patients with wild type. Resistance mutation was not detected in 7 patients. This study shows that resistance to 3TC tends to develop rapidly in patients with baseline mutations or two drugs combination therapy than in those treated simultaneously with triple drugs. This report is the first on resistance to 3TC in Korean AIDS patients.

Key Words: 3TC resistance, HIV, Reverse transcriptase, M184V, Sequencing

서 론

AIDS 백신이 없는 현 상황에서 인면역결핍 바이러스 (HIV) 감염자를 위한 최선의 치료 목표는 작용기전이나 target site가 다른 여러 가지 약제를 병용하여 체내 바이러스 증식을 최대한 억제하여 viral burden을 줄이는 것이다. 이를 위해 highly

active anti-retroviral therapy (HAART)가 도입되어 실시되고 있는데 이는 증식하는 바이러스 (replicating virus)에 대해서는 효과적으로 작용하지만 resting CD4⁺ T 세포내 host chromosome내에 삽입 (inserted)된 provirus에 대해서는 효과가 없다. 따라서 체내 바이러스를 제거 (eradicate)하지 못한다. 이러한 결과로 provirus 상태로 장기간 치료 약제에 노출된 바이러스는 결국 내성을 갖게 된다^{8,13}.

접수 : 2000년 7월 24일, 게재결정 : 2000년 8월 28일

*책임저자: 조영걸, 138-040, 서울시 송파구 풍납동 388-1, 울산의대 미생물학교실
전화 및 팩스: 822-2224-4283, E-mail: ykcho2@www.amc.seoul.kr

Table 1. Baseline characteristics of 20 HIV-1 infected patients

Patient no.	Sex/Age/Year ^a	Resistance mutations to RTI	Exposed drugs (months) ^b	CD4 ⁺ T cells/ μ l	ICD-p24 Ag. (pg/ml)
1	M36/1990	67G/70R/215F/219Q	ZDV/ddI/IDV (91)	1	49
2	M41/1989	67N/70R/215F/219Q	ZDV/ddI/RTN (52)	40	0
3	M36/1993	67N/70R/215F/219Q	ZDV/ddI (40)	3	196
4	M38/1991	70R	ZDV (75)	695	0
5	M15/1991	WT	-	249	41
6	M48/1992	WT	ZDV/ddI (30)	189	49
7	M28/1992	70R	ZDV/ddI (11)	72	0
8	M17/1991	67N/70R/219Q	ZDV (78)	95	109
9	M42/1993	67N/70R/219Q	ZDV/RTN (27)	65	0
10	M36/1991	70R	ZDV/RTN (69)	307	0
11	M30/1990	41L/70R	ZDV (91)	228	25
12	F38/1988	WT	-	42	0
13	M8/1992	WT	ZDV/ddI (22)	150	0
14	M30/1990	WT	ZDV/ddI (28)	8	0
15	M26/1989	WT	-	18	0
16	F24/1987	WT	ZDV (26)	6	71
17	M34/1989	WT	-	28	25
18	M32/1991	NT	-	38	NT
19	F42/1992	NT	ZDV/IDV (18)	390	NT
20	M42/1992	WT	-	290	0

Age/year^a; the age / in the year of HIV-1 diagnosis, RTI; Reverse transcriptase inhibitors, ZDV; Zidovudine, RTN; Ritonavir, 3TC; Lamivudine, ddI; Didanosine, IDV; Indinavir, WT; wild type at reverse transcriptase codons 32 to 229, NT; not tested. (months)^b; the duration of ZDV intake.

다시 말해 바이러스가 어떤 약물에 장기간 노출되면서 스스로 점차 survival fitness를 향상시켜서 drug pressure하에서도 증식을 할 수 있는 능력을 갖추게 된다.

FDA 공인을 받아 현재 사용되고 있는 14가지 성분의 모든 AIDS 치료제는 *pol* 유전자가 encoding 하는 protease나 reverse transcriptase (RT)를 target site로 하고 있어 antiretroviral drugs에 대한 내성은 모두 *pol* 유전자를 구성하는 protease와 RT상의 특정 아미노산이 치환되어 나타난다. 이렇게 특정 아미노산으로 치환시 해당 약물에 대한 sensitivity가 현저히 감소하고 실제로 이때 체내 바이러스 농도가 증가하고 CD4⁺ T 세포수도 감소한다³⁾. 따라서 내성주를 조기에 탐지하여 내성이 없는 약

으로 교체하는 것이 필수적이다.

현재 사용되고 있는 모든 치료제에 대한 각각의 특이적인 내성 부위가 모두 잘 알려져 있으며 combination 하는 치료제의 종류에 따라 새로운 부위가 계속 보고되고 있다⁴⁾. 그리고 일부 선진국에서는 antiretroviral drugs의 광범위한 사용으로 이미 새로이 감염되는 환자에서도 내성 보유 바이러스 빈도가 1995~96년에 42%로 증가하여 AIDS 치료를 시작하기 전에 내성 검사를 하는 것이 필요하다⁴⁾. 내성주를 탐지하는 방법으로는 phenotyping과 genotyping 두 가지가 있는데 후자가 실시하기 용이하여 널리 이용되고 있다. Genotyping에 의한 mutant genotype의 탐지는 바이러스 농도의 증가 (viral rebound)가 나타나기 전에 가능하

므로 virological failure에 대한 일종의 early marker 이다¹³⁾. 따라서 선진국에서는 치료 시작 전, CD4⁺ T 세포수가 감소하거나 바이러스 농도가 증가시 및 치료제를 교체시 genotyping을 하는 것이 일반적이다.

연구자들은 zidovudine (ZDV) monotherapy에 대한 genotypic resistance 실태를 최근 처음으로 보고한 바 있다¹⁾. 현재 국내외적으로 가장 흔하게 사용하는 drug combination은 ZDV, lamivudine (3TC)와 protease inhibitor (PI)인 Indinavir (IDV)이다. 본고에서는 1997년부터 국내에서 사용되기 시작한 3TC에 대한 내성 돌연변이 실태를 RT 32-229 아미노산 서열 분석을 통해 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 환 자

HIV 감염자들은 1987~1993년에 HIV-1 감염자로 진단받은 20명을 대상으로 하였다. 본 연구 대상자 20명 중 14명은 이미 ZDV 등을 복용해 왔으며 9명은 3TC를 복용하기 전에 이미 RT 억제제에 대한 baseline mutation을 하나 이상 가지고 있었다 (Table 1). 12명은 CD4⁺ T 세포수가 100/μl 이하인 말기 AIDS 환자였다. 그리고 8명은 ICD-p24 항원이 탐지되었고 이 중 7명은 치료제를 복용중인 상태였다. 최종 검사 기준으로 3TC 평균 복용기간은 13.1±9개월 (2~30개월)이었다. 3TC 하루 복용량은 150 mg씩 2회였고, ZDV는 200 mg씩 3회, 그리고 IDV는 800 mg씩 3회였다.

2. CD4⁺ T 세포수 측정 및 ICD-p24 항원 탐지

CD4⁺ T 세포수 및 CD8⁺ T 세포수는 이미 발표한 바³⁾대로 Simultest reagent로 염색한 후 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 퍼센트를 flow cytometer로 측정하여 임파구 절대수와 곱하여 구하였다.

Immune complex dissociated (ICD) p24 항원은 ELISA 방법으로 (Dupont, USA)로 측정하였으며 측정 유효 농도는 25 pg/ml 이상이다. p24 항원과 anti-p24 항체가 결합한 것을 분리하기 위해 산을 처리한 후 중화하는 과정을 거친다. 약술하면 별도로 uncoated 96 well plate에 혈청과 standard 등을 넣은 후 동량의 1.5 M glycine을 넣어 잘 반응시킨 후 1.5 M Tris를 넣어 중화시킨다. 잘 섞은 후 150 μl씩을 항체가 coated된 96 well plate에 옮

겨 반응시킨다. 나머지 과정은 일반 ELISA 방법과 동일하다²⁾.

3. Nested PCR과 direct sequencing

Polymerase chain reaction (PCR)과 direct sequencing 방법은 다음과 같다. 말초혈액단핵구 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC)를 검체로 사용하였다. 일차 PCR은 primers JA99 (5'-GGGGG-AATTGGAGGTTTTATCAAAG-3'; 2394-2418)와 RIT137 (5'-TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC-3'; 3301-3325)를 사용하여 RT codons 1에서 219까지를 포함하는 931 base pairs (bp)를 증폭하였다¹⁰⁾. 2차 PCR은 전반부 (257 bp; codon 13-98), 중반부 (428 bp) 및 후반부 (319 bp; codon 152-259)로 나누어 overlap 되게 실시하였다. 전반부를 위한 primers는 523 (5'-AAGCCAGGAATGGAT-3'; 2586-2603)과 526 (5'-TGCAGGATGTGGTATTCTCAA-3'; 2824-2843)였고 중반부를 위한 primers는 RT-A; 5'-GGCCTGAAAATCCATATA-3'; 2701-2719)와 RT-D; 5'-CTAAGTCAGATCCTACATATAA-3'; 3108-3128, 후반부를 위한 primers는 527 (5'-GGATGG-AAAGGATCACCAGCAATA-3'; 3003-3026)와 530 (5'-CCCATCCAAAGGAATGGAGGTTCT-3'; 3202-3225)이었다¹⁾. 상기한 primers의 번호는 HIV-1 NL 43을 기준으로 하였다.

결 과

1. Lamivudine (3TC) 복용 시작 시점에서의 M184V 탐지 유무

본 연구 대상자 20명 중 14명은 Lamivudine를 복용하기 전에 ZDV이나 IDV를 복용해 왔고 이들 중 9명은 이미 ZDV에 대한 baseline mutation을 가지고 있었다. 그러나 3TC를 복용하기 전에 채혈된 18건의 검체로부터 얻어진 염기서열에서 3TC나 ddI에 대한 내성 아미노산이 전혀 탐지되지 않았다 (Table 1).

2. 3TC 복용기간 및 M184V 탐지 시기

최종 검사 성적을 기준으로 20명의 3TC 복용기간은 13.1±9개월 (2~30개월)이었다. 3TC에 대한 내성 돌연변이 M184V는 20명 중 6명 (30%)에서 탐지되었고 또 다른 2명에서는 baseline에서 보다 ZDV에 대한 내성 돌연변이 수가 증가하였다. M184V가 탐지된 6명에서 3TC에 대한 내성 탐지

조영결 등: 라미부딘 내성 유전자 검색

Table 2. Additional resistance mutation to lamivudine (3TC) and zidovudine (ZDV) in the 20 HIV-infected patients after combination therapy with 3TC

Patient no.	3TC therapy (months)	Additional mutations	Combination therapy with	CD4 ⁺ T cells/ μ l	ICD-p24 antigen ^a	Accession number ^b
1	5	V118I	ZDV/IDV	8	+	AF273149
	13	V118I/M184V	ZDV/IDV	13	-	AF273150
2	20	-	ddI/IDV	204	-	AF273164
	25	V118I/M184V	ddI/IDV	332	-	AF282137
	30	V118I	ddI/IDV	348	-	AF282138
3	25	-	ddI/IDV	295	-	AF282163
	29	-	ddI/IDV	426	-	AF282164
4	7	M184V	ZDV	923	-	
	12	M184V	ZDV	900	-	
	19	M184V	ZDV	652	-	AF282151
	24	-	ZDV only	435	-	AF282152
5	12	M184V	ZDV	294	-	AF282148
	18	M184V	ZDV	326	+	AF282149
6	<11	M184V	ZDV/IDV	63	+	AF282161
7	8	-	ZDV/IDV	239	-	AF282156
	19	M184V	ZDV/IDV	248	-	AF282157
8	2	-	ZDV	134	-	AF282150
9	8	-	ZDV/IDV	59	+	AF282165
10	27	-	ZDV/IDV	337	-	AF282147
11	3	-	ZDV/IDV	396	-	AF273176
12	10	WT	ZDV/IDV	271	-	AF282135
13	10	M41L	ZDV/IDV	574	-	
	17	M41L/67N ^c /T215Y	ZDV/IDV	507	-	AF282153
14	14	M41L/T215Y	ZDV/IDV	8	+	AF282140
15	3	WT	ZDV/IDV	118	-	
	12	WT	ZDV/IDV	139	-	AF282139
16	5	WT	ZDV/IDV	203	-	AF273153
17	10	WT	IDV	233	-	AF282136
18	2	WT	ZDV/IDV	121	-	AF273183
19	3	WT	ZDV/IDV	898	-	AF282162
20	5	WT	ZDV/IDV	279	-	AF282158

a; +, detected over 25 pg/ml and -, undetectable, b; GenBank accession number, c; mixed genotype of D67 and 67N, WT; wild type at RT codons 32 to 229.

시기는 3TC 복용 후 각각 7, 11, 12, 13, 19 및 25개월이었다 (Table 2). 내성 돌연변이 수가 증

가된 8명 중 4명에서는 CD4⁺ T 세포수가 감소하였고 돌연변이가 추가되지 않은 나머지 12명 중

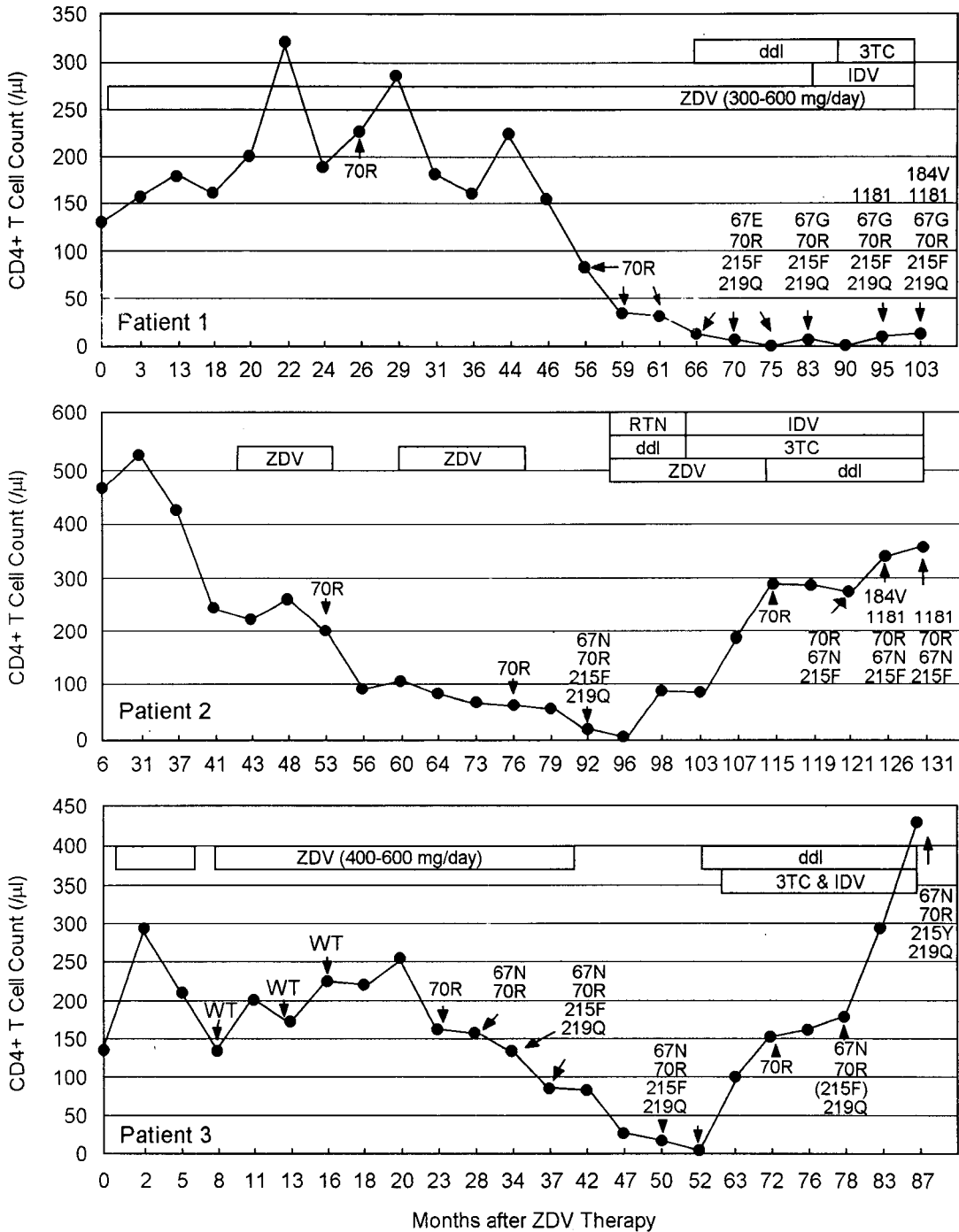


Figure 1. Despite triple drugs combination therapy, resistance mutations to reverse transcriptase (RT) inhibitors accumulate in RT. As the duration of therapy prolongs, multiple resistance mutations (M184V and V118I to 3TC; K70R, D67N/E/G, T215F/Y, and K219Q to ZDV) developed in 3 patients with best adherence. In particular, the patient 1 who developed D67E from month 66 and D67G from month 83, did not show any response to triple therapy probably because of serial addition of drug, one by one. The patient also showed accumulation of 8 resistance mutations to IDV at month 103. On the other hand, the patients 2 and 3 treated with 3TC, IDV, and ddl, showed good response in part because the resistance to ddl and IDV was not developed.

조영걸 등: 라미부딘 내성 유전자 검색

Patient no.	32	41	65	67	70	74	88	97	
	KALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHP-Con								
1						G.	NR.		
2	T.	A.				N.	DR.		
3						N.	NR.		
4				R.		R.			
5,6									
7						R.			
8						N.	NR.		
9						N.	R.		
10						R.		K.	S.
11		L.				N.	NR.		
12,15									
13		L.							
14		L.							
16								K.	
18	T.	N.							
19	T.	AD.	R.			I.			
17,20									
Patient no.	98	118						163	
	AGLKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSS-Con								
1			I.					T.	
2		N.		I.	K.				
3		R.			K.				
4,11									
5,9								T.	
7		RR							
8		R.							
10				??????					
12								V.	
13					KE.				
14						V.			
15					K.				
16									
17									
18								V.	
20								T.	
Patient no.	164	184	200	210	215	219	229		
	MTKILEPFRKQNPDI VIYQYMDDL YVGS DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLW-Con								
1			V.				LF.	Q.	
2	D.	E.		E.	V.	K.	K.	LF.	Q.
3		R.			I.	V.		Y.	Q.
4			V.				E.		
5		K.	V.	K.	V.	V.	E.		
6			V.						
7	R.	K.	V.					L.	
8							I.	V.	Q.
9							I.	V.	
10	R.	R.					V.		
11							I.		
12									K.
13	I.		L.				I.		K.
14							I.		K.
15							E.	I.	
16			L.				E.		
17									I.
18			E.	D.					E.
19									K.
20									R.

Figure 2. Alignment of amino acids of HIV-1 reverse transcriptase in patients treated with RT inhibitors. The sequences were obtained from the last sample in each patient. There was no mutation associated with ddI and ddC resistance (K65R, Y69D, L74V, and M184I). HIV-1 RT sequences from patients #2, 18, and 19 were not subtype B but recombinant strain. Con; consensus sequences from Korean patients.

에서는 1명에서만 감소하였다 ($p=0.035$).

20명 중 7명 (환자 #12 및 15~20, Table 2)에서는 RTI에 대한 내성 돌연변이가 전혀 탐지되지 않았는데 이들의 3TC 복용기간은 모두 12개월 이하였다. 그러나 환자 #16은 기왕에 88개월 동안 약 26개월 정도 간헐적으로 ZDV를 장기간 복용하여 3TC 복용 16개월 전에 K70R이 10개월 전에 L210W과 T215Y가 탐지된 바 있고 (Patient #1 in Table 2)¹⁾ 환자 #19는 3TC 복용 전에 ZDV과 IDV를 18개월간 복용해 왔었다.

3. 복용기간에 따른 M184V 빈도

복용기간에 따른 M184V 탐지율은 3TC 복용기간이 12개월 이내에서는 13% (2/15)였고 12개월 이상에서는 47% (7/15)였다. 12개월 이상 지속적으로 3TC를 복용한 10명 중 M184V가 탐지되지 않은 환자는 5명으로 가장 오래된 환자는 29개월이었다 (#3, Table 2). 그러나 5명 중 2명에서는 (#13과 14) baseline에서 보다 증가된 ZDV 내성 돌연변이를 갖고 있었다. 또한 M184V 탐지율은 3TC를 복용하기 전에 이미 ZDV에 대한 내성을 가지고 있었던 환자군에서는 55% (5/9명)이었고 wild type인 환자군에서는 11% (1/9명)로 내성을 가진 군에서 높게 나타났다 ($p=0.069$). 6명 중 M184V가 가장 먼저 탐지된 환자 #4는 IDV에 대한 부작용으로 인해 ZDV과 3TC만을 복용하였는데 3TC 복용 전에 이미 ZDV를 75개월 복용하였고 3TC 복용 7개월째 M184V가 탐지되었다.

4. V118I의 탐지

또한 3TC에 대한 moderate resistance를 나타낸다고 최근 보고된 118I는 이미 ZDV에 대한 내성 codons를 4개 이상 보유한 적이 있었던 2명 (환자 #1과 2, Fig. 1)에서만 나타났다 (AF273149, AF273150, AF283137 및 AF283138). 한편 환자 #2에서는 25개월째 M184V가 처음 탐지된 후 30개월째 (감염 진단 131개월째)에는 탐지되지 않았다.

5. 장기간 ZDV를 복용한 환자에서의 내성 돌연변이 추적

장기간의 ZDV monotherapy로 ZDV에 대한 baseline mutation이 4개 있었던 환자 #1, 2와 3은 CD4⁺ T 세포수도 10/μl 이하이고 baseline 돌연변이 수도 4개로 임상적으로 상태가 비슷하였다. 환자 #1은 약물 복용을 철저히 하였음에도 불구하고 ZDV을

장기간 복용한 후 ddI, IDV 및 3TC를 하나씩 추가 하였으나 치료제에 전혀 반응을 보이지 않았다 (Fig. 1). 특히 진단 후 66개월째부터 통상적으로 나타나는 내성 돌연변이 D67N 대신 D67E가 나타났고 83개월째부터는 D67G가 탐지되기 시작하였고 103개월째 사망하였다. 반면에 환자 #2와 3은 3TC와 IDV를 동시에 추가한 후 장기간 복용한 ZDV 대신 ddI로 바꾸어 CD4⁺ T 세포수의 지속적인 증가를 보여주었다 (Fig. 1).

6. 바이러스 항원 p24 농도 변화

ICD-p24 바이러스 항원은 baseline에서는 8명에서 탐지되었는데 3TC 복용 후에는 5명에서 탐지되었다. M184V가 탐지된 환자의 50% (3/6명)에서 p24 항원이 탐지되었고 M184V가 탐지되지 않은 환자 14% (2/14명)에서 탐지되었다 ($p>0.05$).

7. 아미노산 서열

20명의 3TC 복용 전에 실시된 염기서열은 GenBank에 등록하였다. GenBank accession number는 Table 1의 환자 번호 #1~17은 순서대로 각각 AF273146, AF273163, AF273206, AF273191, AF273185, AF273203, AF273197, AF273189, AF273207, AF273184, AF273175, AF273157, AF273193, AF273169, AF273166, AF273152 및 AF282949이고 환자 #20은 AF273201이다.

20명의 3TC 복용 후 최종 검체로부터 결정된 염기서열의 GenBank accession number는 Table 2와 같으며 이들의 아미노산 서열은 Fig. 2와 같다. 3TC 복용 전후 모든 검체에서 다제내성을 나타내는 Q151M은 하나도 탐지되지 않았다.

고 찰

1997년부터 국내에서도 ZDV, 3TC나 ddI 중 2가지와 PI인 IDV를 포함한 triple drugs combination가 광범위하게 사용되고 있으나 아직 이들 치료제에 대한 내성 문제에 대해서는 보고가 없다. 일반적으로 IDV나 ZDV과 같은 약물에 대한 high-level resistance가 일어나기까지는 비교적 긴 시간인 6개월에서 2년이 걸린다. 이는 ZDV에 대한 내성의 경우 M41L, D67N, K70R, L210W, T215F/Y과 K219Q 6개의 돌연변이 중 2개 이상, IDV에 대한 내성의 경우 L10V, K20M/R, M46I, I54V, L63P, A71TV, V82A/F/T, I84V와 M90L 중 적어도 3~4

개 이상 축적되어야 의미있는 내성이 나타나기 때문이다⁴⁾. 그러나 3TC에 대한 내성은 역전사효소상의 아미노산 코돈 184에서의 돌연변이 하나 (methionine; M → valine; V 혹은 isoleucine; I)가 발생함으로써 초래된다. 이는 치료 시작 3개월경에 약 95%에서 탐지될 정도로 빨리 나타나며¹⁵⁾ 나타날 시 약 1000배의 감수성 저하가 초래된다⁹⁾. 그리고 최근에 V118I가 M41L과 T215Y/F가 동반될 경우 3TC에 대한 moderate resistance (4~50배 감수성 저하)를 나타내는 것으로 보고되었으나¹⁰⁾ 3TC를 전혀 복용한 적이 없는 환자 2명에서도 탐지되어 (AF282134 및 AF273210) 118I의 의미에 대해서는 좀 더 연구가 되어야 하겠다.

복용기간에 따른 M184V 내성빈도를 보면 본 연구 대상자들의 17명이 PI를 병용하였음에도 불구하고 3TC 복용기간이 12개월 미만인 검체에서 13%, 12개월 이상 복용한 검체에서 47%로 증가하였다. 이는 본 연구자들이 발표한 ZDV 단독 복용시 발생한 내성 돌연변이 T215F/Y의 탐지율 6.7% (<12개월)와 22.7% (>12개월) 보다¹⁾ 각각 높았다. 일반적으로 3TC monotherapy시는 치료 시작 1개월 이내에 이미 M184V가 탐지되는 것으로 알려져 있으나¹⁵⁾ 환자 #4는 baseline CD4⁺ T 세포수도 높고 p24 항원도 음성이고 내성 돌연변이로는 K70R 밖에 없었던 점을 고려하면 184V의 출현은 예상 외로 빨랐다. 그리고 이 환자에서는 3TC 복용을 중단한지 40일만에 M184V는 소실되었다. 이는 일반적으로 3TC나 nonnucleoside RT inhibitors를 포함하는 partially suppressive regimens은 pre-existing resistant variants의 비약적인 증식으로 인해 빠르게 실패한다는 사실¹¹⁾에 해당한다.

환자 #1은 유일하게 wild type D67에서부터 ddI 복용 동안 돌연변이 D67E이 발생하였고 IDV 복용 동안에 D67G로 이행하는 과정을 보여주었고 D67E가 나타난 이후 치료에 반응을 보이지 않았다. D67G를 보유한 환자는 외국에서도 HAART 치료에 실패한 경우^{6,7)}로 최근 몇 예가 보고된 바 있다. 아울러 이 환자에서는 IDV에 대한 내성 돌연변이가 8개 탐지되었다. 따라서 치료제를 추가하거나 교체시 반드시 2가지 이상을 동시에 하는 것이 필수적임을 확인할 수 있었다.

ddI에 대한 내성 발현 부위는 K65R, L74V과 M184V로 M184V가 3TC에 대한 내성과 중복된다. 특히 환자 #1, 2 및 3에서 ddI를 장기간 복용하였으나 환자 #1과 2에서는 V118I와 M184V가

동시에 나타났고 K65R과 L74V는 탐지되지 않은 것으로 미루어 ddI에 대한 내성은 발현되지 않은 것으로 판단된다. 따라서 본 연구 대상 환자에서는 ddI에 대한 내성 돌연변이 K65R나 L74V는 없었다. 그리고 Q151M은 ZDV과 zalcitabine 혹은 ZDV과 ddI 같은 multiple dideoxynucleosides를 장기간 병용하는 환자들에서 탐지되며 1년 이상 복용시 3.5~19%에서 나타나는 것으로 보고되고 있으나¹²⁾ 본 연구 대상자를 포함하여 국내 환자에서는 아직 탐지되지 않았다.

PI 복용 유무에 관계없이 RT에서의 내성 돌연변이가 추가된 경우는 CD4⁺ T 세포수가 감소하였고 돌연변이가 추가되지 않은 나머지 12명 중 11명에서 CD4⁺ T 세포수가 증가하여 내성과 CD4⁺ T 세포수 사이에 관련이 있음을 알 수 있었다 (p=0.035).

치료 효과 평가에 있어 중요한 요소 중 하나가 drug adherence인데 본 연구 대상자 중 환자 #5, 6 및 14는 약물 복용 정도가 50% 내외로 낮았고 나머지는 90% 이상이었다. 정확한 내성 발생률을 평가하기 위해서는 adherence failure를 therapy failure와 구분하여야 할 것이다.

본 연구 대상 환자들에서 내성 발현에 대한 정확한 평가는 대부분 PI를 병용하였기 때문에 PI에 대한 내성 유무를 확인한 후 종합적으로 판단하는 것이 필요하겠지만 본 연구를 통해 상기한 3가지 약제를 처음부터 동시에 복용하기 시작하는 것이 내성 발현을 지연시킬 수 있음과 genotyping을 통해 각 환자에 적절한 치료제의 선택이나 교체에 큰 도움이 됨을 확인할 수 있었다.

결 론

국내에서 널리 사용되고 있는 AIDS 치료제들 중 lamivudine (3TC)에 대한 내성 유전자 보유 실태를 파악하기 위해 3TC 복용자 20명에게서 얻은 PBMC 검체를 재료로 HIV-1 역전사효소 아미노산 codons 32-219의 염기서열을 결정하였다.

1. 연구 대상자 20명 중 14명은 3TC를 복용하기 전에 이미 antiretroviral drugs을 복용해 왔다. 이들 14명 중 9명은 3TC를 복용하기 전에 이미 zidovudine에 대한 mutation을 적어도 하나 이상 가지고 있었다. 이들 9명에서 M184V 발생률은 55% (5/9명)로 wild type이었던 환자군에서의 11% (1/9명) 보다 높게 나타났다 (p=0.069).

2. 20명의 최종 검사 기준으로 3TC 복용기간은 13.1±9개월 (2~30개월)이었고 3TC에 대한 내성 돌연변이 M184V는 6명 (30%)에서 탐지되었다.

3. 3TC 복용기간이 12개월 미만인 검체에서는 M184V가 13% (2/15)에서, 복용기간이 12개월 이상된 검체에서는 47% (7/15)에서 탐지되었다. 복용 12개월 이내에 내성이 발현된 환자들은 약제를 2가지만 복용하였거나 drug adherence가 낮은 환자였다.

4. RTI에 대한 다제내성을 나타내는 Q151M은 전혀 탐지되지 않았다.

이러한 성적을 통해 3TC에 대한 내성 돌연변이 발생을 지연시키기 위해서는 RT inhibitors 두 가지와 PI 한 가지를 포함한 3가지 약제를 동시에 충실히 복용하도록 지도하는 것이 중요함을 의미한다.

감사의 말씀

본 연구는 아산생명과학연구소의 연구비 지원 (1999-062와 2000-062)에 의해 이루어졌음. 저자들은 부산시 영도구보건소 한연식님, 동구 보건소 김상일님과 의정부 보건소 신성희님의 협조에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 조영걸, 이희정, 성홍섭, 김유겸, 김영봉, 이용진, 김미정, 김대곤, 원영호, 조근제: 인면역결핍바이러스 *pol* 유전자 염기서열 결정에 의한 지도부딘 (ZDV) 내성 돌연변이의 탐지. 대한바이러스학회지 **29**: 271-281, 1999.
- 2) 조영걸, 이희정: 인면역결핍 바이러스 감염자에서 ICD-p24 항원 탐지가 CD4+ T 세포수 및 예후에 미치는 영향. 대한바이러스학회지 **26**: 259-267, 1996.
- 3) 조영걸, 이희정, 김영봉, 오원일, 김유겸: HIV-1 C2/V3 region 염기서열 분석 및 이의 임상적 의의: 고려홍삼 복용이 HIV 유전자에 미치는 영향. 대한미생물학회지 **32**: 611-623, 1997.
- 4) Birk M, Sonnerborg A: Variations in HIV-1 *pol* gene associated with reduced sensitivity to antiretroviral drugs in treatment-naive patients. *AIDS* **12**: 2369-2375, 1998.
- 5) D'Aquila RT, Johnson VA, Welles SI, et al: Zidovudine resistance and HIV-1 disease progre-

- ssion during antiretroviral therapy. *Ann Intern Med* **122**: 401-408, 1995.
- 6) Deeks SG, Hellmann NS, Grant RM, Parkin NT, Petropoulos CJ, Becker M, Symonds W, Chesney M, Volberding PA: Novel four-drug salvage treatment regimens after failure of a human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-containing regimen: antiviral activity and correlation of baseline phenotypic drug susceptibility with virologic outcome. *J Infect Dis* **179**: 1375-1381, 1999.
- 7) de Jong JJ, Goudsmit J, Lukashov VV, Hillebrand ME, Baan E, Huismans R, Danner SA, Ten Veen JH, de Wolf F, Jurriaans S: Insertion of two amino acids combined with changes in reverse transcriptase containing tyrosine-215 of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. *AIDS* **13**: 75-80, 1999.
- 8) Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, et al: Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Medicine* **5**: 512-517, 1999.
- 9) Gao Q, Gu ZX, Parniak MA, et al: The same mutation that encodes low level human immunodeficiency virus type-1 resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine confers high-level resistance to the (-) enantiomer of 2'-2'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 1390-1392, 1993.
- 10) Hertogs K, Bloor S, de Vroey V, et al: A novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutational pattern confers phenotypic lamivudine resistance in the absence of mutation 184V. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 568-573, 2000.
- 11) Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Demeter LM, Hammer SM, Jacobsen DM, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Vella S, Richman DD: Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection. *JAMA* **279**: 1984-1991, 1998.
- 12) Maeda Y, Venzon DJ, Mitsuya H: Altered drug sensitivity, fitness, and evolution of human immunodeficiency virus type 1 with *pol* gene mu-

- tations conferring multi-dideoxynucleoside resistance. *J Infect Dis* **177**: 1207-1213, 1998.
- 13) Rodriguez-Rosado R, Briones C, Soriano V: Introduction of HIV drug-resistance testing in clinical practice. *AIDS* **13**: 1007-1014, 1999.
- 14) Rubio A, Leal M, Pineda JA, et al: Increase in the frequency of mutation at codon 215 associated with zidovudine resistance in HIV-1 infected anti-viral-naive patients from 1989 to 1996. *AIDS* **11**: 1184-1186, 1997.
- 15) Schuurman R, Nijhuis M, Van Leeuwen R, Schipper P, de Jong D, Danner SA, Mulder J, Loveday C, Christopherson C, Kwok S, Sninsky J, Boucher CAB: Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J Infect Dis* **171**: 1411-1419, 1995.
- 16) 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.
-