

HIV 감염자에서 유전형
내성검사법을 이용한
항레트로바이러스제 내성 규명

연세대학교 대학원

의과학과

김 리 연

HIV 감염자에서 유전형
내성검사법을 이용한
항레트로바이러스제 내성 규명

지도교수 김 준 명

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 리 연

김리연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2007년 6월 일

감사의 글

석사 학위를 먼저 하나님께 바칩니다.

부족한 저에게 항상 옆에서 위로와 격려를 해주신 김준명 교수님께 감사드립니다. 먼저 챙겨주시고 논문을 쓰는데 많은 도움을 주신 최준용 선생님께도 감사드립니다. 그리고 논문 심사위원으로 논문을 도와주신 김동수 교수님과 이봉기 교수님께도 감사드립니다. 그 외 너무 정든 우리 감염내과 김명수 선생님, 김창오 선생님, 박윤선 선생님, 신소연 선생님 감사드립니다. 이제 유부녀가 된 김영화 선생님 정말 언니같이 옆에서 항상 이끌어 주셔서 너무 감사 합니다. 재경씨도 서로 같이 보낸 시간이 짧아 너무 아쉽고, 먼저 졸업한 봉민이도 고맙고 여기서 함께한 모든 이들에게 감사 합니다.

석사 기간 동안 많은 일들이 있었으나 저에게 삶의 방향을 찾게 해주신 열린 선교 교회 김용욱 목사님과 권교욱 전도사님께 또한 고마움을 전달하고 싶습니다. 우리 식구들 드림 셀에게도 고마움을 전합니다.

이제껏 저를 키워주시고 사랑해주신 아버지, 어머니! 정말 감사하고 고맙고 사랑합니다. 훌쩍 그 곁을 떠나버려서 너무나 죄송하지만 실망 시키지 않는 딸이 되겠습니다. 부족한 저를 가족으로 맞이해주신 저의 시아버지와 시어머니께도 감사드립니다. 저의 하나뿐인 동생 병기와 할머니 그리고 언니 같은 형님들, 아주버님...저에게 너무 많은 가족들이 생겨서 석사기간을 마치는 지금 저는 너무 행복합니다.

마지막으로 저의 하나뿐인 남편 기웅씨! 어떤 말로도 사랑을 다 표현 할 수 없지만 고맙고 사랑한다고 말하고 싶습니다. 이 모든 영광은 주님께 돌립니다.

저 자 씀

차 례

그림 및 표 차례	
국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. PBMC 준비와 보관	6
2. Genotyping	6
가. RNA extract	6
나. RT	7
다. PCR	7
라. Nested PCR	8
마. Elution	9
바. Sequencing	10
사. 결과 분석	11
III. 결과	12
1. 검사 대상자	12
2. 유전형 내성검사법 결과	13
가. RT-PCR 결과	13
나. Nested PCR 결과	13
3. 내성 양상	14
IV. 고찰	16
V. 결론	20
참고 문헌	22
Abstract	31

그림 차례

그림1. PCR의 결과.....	13
그림2. nPCR의 결과.....	14

표 차례

표1. RT의 조건.....	7
표2. PCR의 조건.....	8
표3. nPCR의 조건.....	9
표4. 검사대상자의 주요 특성.....	12
표5. 검사대상자의 내성 양상.....	15

국문 요약

HIV 감염자에서 유전형 내성검사법을 이용한 항레트로바이러스제 내성 규명

<지도교수 김 준 명>

연세대학교 대학원 의과학과

김 리 연

1987년 human immunodeficiency virus (HIV)에 대한 zidovudine의 효과가 보고되었고, 그 후 1991년 zidovudine을 포함한 2제 병용요법이 시도 되었으며, 1995년에는 Gag, Gag-Pol poly protein 전구체의 처리를 억제하는 단백분해효소억제제(protease inhibitor; PI)가 도입되었으며 이러한 약제와 더불어 highly active antiretroviral therapy (HAART)가 시행되었다.

HAART에 의해 바이러스 양이 현저히 감소하고 면역기능이 회복되면서 기회감염 및 사망률이 크게 저하되었지만, 장기간의 치료제 복용으로 바이러스의 불완전한 억제로 인하여 내성이 발현되고, 또한 부작용 때문에 치료가 지속적으로 이루어지지 않아 내성이 발현되었다. 따라서 치료 실패에 따른 재치료의 경우 내성검사가 요구되며, 최근에는 초치료 환자에게도 내성검사가 권장되고 있다.

항레트로바이러스 치료제의 내성을 분석하는 방법으로는 유전형 내성분석법(genotyping resistance test)과 표현형 내성분석법(phenotyping

resistance test)이 있다. 유전형 내성분석법은 reverse transcriptase 및 protease 와 관련된 HIV 유전자의 염기서열을 분석하여 내성 돌연변이의 유무를 알아보는 방법이다. 표현형 내성분석법은 항레트로바이러스 치료제들의 서로 다른 농도 하에서의 바이러스 증식력을 분석하는 방법이다.

HIV 감염자의 수가 제 3세계에서 절대적 다수를 차지하는 현실에서 유전형 내성분석법의 상품화된 kit의 비싼 수가는 임상에서 이용하는데 많은 제한점이 있어왔다. 본 연구는 유전형 내성분석법을 실험실 내에서 자체 개발함으로써 환자의 치료에 경제적으로 유용하게 적용하는데 의의와 목적이 있다.

자체 개발된 유전형 내성분석법을 이용하여 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에 내원한 치료 경험이 없는 10명의 감염자(남자 9명, 여자 1명, 평균 연령 32.4세)를 대상으로 내성 양상을 분석하였다.

10명의 감염자 중 nucleoside reverse transcriptase inhibitor(NRTI) 내성과 관련된 돌연변이는 2예에서 V118I가 나왔으며, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor(NNRTI)의 경우 아무 예에서도 나오지 않았으며, protease inhibitor (PI)의 경우는 7예에서 L10I, M36I, A71V/T, V77I가 나왔다. 상품화된 kit 와 비교분석한 결과 100% 일치하였다.

유전형 내성 검사법을 자체 개발함으로써 임상에 적용시 상품화된 kit 보다 경제적이고 신속하게 내성검사가 가능하므로 치료 효과 증진에 큰 유익을 가져 오리라 생각한다.

핵심 이 되는 말: 인체면역결핍바이러스, 인체면역결핍바이러스감염, 후천성면역 결핍증, 항레트로바이러스치료, 유전형내성검사법, 치료제 내성

HIV 감염자에서 유전형 내성검사법을 이용한

항레트로바이러스제 내성 규명

<지도교수 김 준 명>

연세대학교 대학원 의과학과

김 리 연

I. 서론

1981년 acquired immune deficiency syndrome (AIDS)가 처음으로 밝혀진 이후 human immunodeficiency virus (HIV) 감염자가 급속히 증가하여 현재는 전 세계적으로 4,000 만명 이상의 감염자가 분포하고 있다.^{1 3} 1987년 미국 식품의약국이 zidovudine을 HIV 감염의 치료제로 사용한 것을 허가한 이래 현재 역전사효소억제제(reverse transcriptase inhibitor; RTI) 15종-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) 12종과 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) 3종-그리고 단백질분해효소억제제(protease inhibitor; PI) 11종, 융합 억제제(fusion inhibitor; FI) 1종 이 승인되어 사용되고 있다.⁴ 특히 단백질분해효소억제제의 도입으로 1995년부터 항레트로바이러스 치료제의 병용요법(highly active antiretroviral therapy; HAART)을 시행해왔다.¹

HAART에 의해 바이러스 양이 현저히 감소하고 면역기능이 회복되면서 기회감염이 크게 저하되었으며, HIV 감염자 및 AIDS 환자의 생명 연장 뿐만 아니라 건강한 상태를 유지 할 수 있게 되었다.^{11 1} 하지만 이러한 장점에도 불구하고 치료제 내성이 제한점이 되고 있는데, HAART를

장기간 치료제로서 복용하면 바이러스의 불완전한 억제로 인하여 내성이 발현되고, 또한 오심, 피부 발진, 복통, 백혈구 감소, 빈혈¹ 등의 부작용으로 치료가 지속적으로 이루어지지 않아 내성이 발현되기 때문에 치료⁶ 실패에 따른 재치료의 경우 내성검사가 요구된다. 또한 HIV reverse transcriptase의 error rate가 높고 HIV의 turnover가 매우 빨라 감염자 체내에 유전적으로 매우 다양한 바이러스가 존재하게 되므로 치료를 시작하기 전에 약제 내성과 연관된 돌연변이를 가진 바이러스가 체내에 존재할 수 있어 초치료 환자에서도 내성검사가 필요하다.

항레트로바이러스 치료제의 내성을 분석하는 방법으로는 유전형 내성분석법(genotyping resistance test)과 표현형 내성분석법(phenotyping resistance test)이 있다. 유전형 내성분석법은 reverse transcriptase 및 protease 와 관련된 HIV 유전자의 염기서열을 분석하여 내성 돌연변이의 유무를 알아보는 방법이며, 표현형 내성분석법은 항레트로바이러스 치료제들의 서로 다른 농도하에서의 바이러스 증식력을 분석하는 방법이다. 위의 분석법 중 어느 것이 더 나은 지에 대한 전향적인 연구결과는 아직 없기 때문에 한 가지 방법을 선택하여 항레트로바이러스 치료제의 내성을 분석할 수도 있으며, 또한 복잡한 치료력을 가지는 경우에는 두 가지 분석법들을 상호 보완적으로 사용할 수 있다.^{1 24}

그렇지만 이들 분석법들은 결과가 나오기까지 상당한 시간과 전문 인력 및 양질의 실험기자재가 요구되며, 과거에 복용하였던 치료제의 경우 내성을 분석하는 데에 한계가 있다는 단점이 있다. 특히⁷ 내성의 원인이 되는 치료제를 중단하게 되면 내성유발 HIV의 증식 및 성장 조건이 없어지므로 내성유발 HIV는 곧 소수로 전락하게 되는데, 내성분석법은 내성유발 HIV가 체내 HIV 중 20% 미만시 분석이 어려워 항상 이를 고려해야

한다.^{2 2}

이러한 제한점들이 있지만, 유전형 내성분석법 또는 표현형 내성분석법에 의한 항레트로바이러스 치료제의 내성결과는 치료실패 원인과 밀접한 연관이 있으며 실제 HIV 감염자의 치료에 도움이 된다는 연구가 많다. 또한 치료를 시작하기 전에도 이러한 내성분석법으로 인해 환자 내 바이러스가 갖고 있는 고유한 내성의 유형과 종류를 알 수 있다면 훨씬 더 치료에 효과가 클 것이다. 초기 감염시기에는 보다 급격한 바이러스 증식을 보이기 때문에 유전형 내성분석법이 선호되며, 감염 후 수년이 지나도 항레트로바이러스 치료제의 억제 효과가 없어도 존재할 수 있는 내성 유발 돌연변이가 있기 때문에 유전형 내성분석법이 도움이 된다.^{2 32}

이러한 유전형 내성분석법을 이용한 상품화된 kit에는 Bayer사의 trugen® 과 Abbott 사의 ViroSeq® 가 있지만, 상품화된 kit 는 8가격이 너무 비싸서 임상적으로 이용하는데 한계가 있다. 이에 본 연구는 유전형 내성분석법을 자체 개발하여 실험실 내에서 경제적이고 신속하게 이용하여 치료에 유용하게 사용하고자 하였다.

II 재료 및 방법

1. 말초혈액단세포(*peripheral blood mononuclear cells; PBMC*) 준비와 보관

모든 환자의 피는 BD vacutainer CPT(BD biosciences, San jose, CA)에 수집되어 원심분리기를 이용하여 말초혈액단세포(*peripheral blood mononuclear cells; PBMC*)를 분리하였다. 이 CPT를 원심 분리기에서 1700g, 20분 4℃로 원심분리를 한 후, 수집된 PBMC는 10% FBS(GIBCO BRL, Greenland, N.Y, USA)의 RPMI 1640(GIBCO BRL) 배지로 2번 세척하고, 10% DMSO(SIGMA-Aldrich, St.Louis, MO)가 포함된 FBS에 넣고 액체질소탱크에 보관하였다.

2. *Genotyping*

가. RNA extract

대상군 혈장 500 μ l을 첨가한 후 잘 섞어주고 이후 실온에서 10분간 반응시켰다. Ethanol(96-100%) 560 μ l을 첨가하고 이 때 2ml collection tube에 QIAamp spin column을 준비하였다. Spin column에 검체 630 μ l을 분주하여 원심분리하고 이를 collection tube에 넣었다. 그리고 남아 있는 검체를 다시 spin column에 분주하고 원심분리하여 collection tube에 넣었다. Buffer AW 500 μ l을 spin column에 첨가하고 원심분리 하였다. 그리고 다시 buffer AW 500 μ l을 spin column에 첨가하고 4분간 원심분리 하여 1.5ml microcentrifuge tube에 넣은 다음 80℃로 가열된 RNase-free water 50 μ l을 첨가하고 원심분리하여 침전물을 제외한 상층액을 모두 제거하고 건조시켰다. 완전히 건조된 RNA에 멸균 증류수 100 μ l을 첨가해 녹인 후에 분리된 RNA는 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

나. Reverse-transcription

우선 조건은 45℃ 5분, 45℃ 30분, 94℃ 2분, 4℃ 로 1 cycle reverse-transcription을 수행한다. Mgcl₂ 4μl, 10×RNA PCR buffer 2μl H₂ O 8.5μl, dNTP mixture 2μl, RNase inhibitor 0.5μl, reverse-transcriptase 1μl, 9mer 1μl, RNA extract 한 sample 1μl 로 total 20μl로 reverse-transcription을 수행한다.

표1. RT의 조건

No	온도(℃)	시간(min.)	비고
1	45℃	5 min.	9 mer 이용, RNA 1μl와 9.5μl(O.D때문)
2	45℃	30 min.	
3	94℃	2 min.	
4	4℃	∞	
Total vol. 20μl			

다. Polymerase chain reaction (PCR)

반응조건은 94℃ 5분간 1 cycle, 그리고 94℃ 15초, 55℃ 20초, 72℃ 2분간 40 cycle, 72℃10분간 1 cycle을 수행하였다. 2μl의 정제된 DNA, 1.5μl의 Mgcl₂, 2.5μl의 10× PCR buffer, 2μl의 dNTP mixture, 0.25μl의 LD Taq, 각각 10pmol/ml의 1μl sequencing primer, 그리고 14.75μl의 멸균증류수를 첨가하여 DNA를 증폭시켰다. HIV HXB2 genome에서 primer sequence로 이용하였다.

* Primer(s) MAW26 5'-*ttgaaatgtgaaaggaaggac*-3' 2028-2051

(as) RT21 5'-*ctgtatttctgctattaagtctttgatggg*-3' 3539-3509

표2. PCR의 조건

No	온도(℃)	시간(min.)	비고
1	94℃	5 min.	
	94℃	15 sec.	
2	55℃	20 sec.	cDNA 2 μ l 이용
	72℃	2 min.	15 sec., 20sec., 2 min.
3	72℃	10 min.	40 cycle로 수행
4	4℃	∞	
Total vol. 25 μ l			

라. Nested PCR

반응조건은 94℃ 5분간 1 cycle, 그리고 94℃ 15초, 63℃ 20초, 72℃ 2분간 35 cycle, 72℃ 10분간 1 cycle을 수행하였다. 2 μ l의 정제된 DNA, 5 μ l의 MgCl₂, 5 μ l의 10 $\times$ PCR buffer, 4 μ l의 dNTP mixture, 0.25 μ l의 LD Taq, 각각 10pmol/ml의 2 μ l sequencing primer, 그리고 29.75 μ l의 멸균증류수를 첨가하여 DNA를 증폭시켰다.

* Primer (s) PR-01 5'-cagagccaacagccccacc-3' 2147-2166

(as) RY-01 5'-ggccatccattcctggctt-3'

(s) RY-02 5'- ctgttgactcagattggttgac-3'

(as) RY-03 5'- tgctggtgatccttccatc-3'

(s) RY-04 5'- ctggatgtgggtgatgcata-3'

(as) RT-20 5'- ctgccagttctagctctgcttc-3' 3462-3441

표3. nPCR의 조건

No	온도(℃)	시간(min.)	비고
1	94℃	5 min.	
	94℃	15 sec.	
2	63℃	20 sec.	PCR product는 2 μ l 이용 15 sec., 20 sec., 2 min. 35 cycle로 수행
	72℃	2 min.	
3	72℃	10 min.	
4	4℃	∞	
Total vol. 50 μ l			

증폭된 DNA fragment를 확인하기 위하여 1% agarose gel에서 TAE buffer로 80V에 40분간 전기영동한 후, ethidiumbromide 용액(0.5 μ l/ml)으로 염색하여 UV transilluminator을 이용하여 band를 확인하였다.

마. Elution

DNA PCR product를 정제하기 위하여 QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, GmbH In, Germany)를 사용하였다. PCR product에 5배의 PB buffer를 넣고 섞은 후 2ml waste tube에 column을 놓고 mixture를 넣었다. 1분간 방치한 후에 원심분리 시킨 다음 용액을 버리고 column에 750 μ l ethanol이 첨가된 PE buffer를 넣고 2-5분간 방치한 후에 원심분리 하였다. 다시 용액을 버리고 빈 column을 원심분리 시켜 완전히 용액을 제거하였다. Column을 microcentrifuge tube에 옮겨 30-50 μ l 멸균증류수를 넣어 원심분리 한 다음 용액을 -20℃에 보관하였다.

바. Sequencing

염기서열 결정은 정제된 PCR product를 주형으로 3종의 forward primer 5'-TCAGAAGCAGGAGCCGATAG;2208-2227, 5'-GTTAAACAATGGCCATTGA;2588-2607, 5'-GGATTAGATATAGTACAATGTGCTT;2971-2996와 3종의 reverse primer 5'-ATGCCTTTATTTTTTCTTCTGTC;2649-2627, 5'-GGTGAATCCTTTCCATCC;3019-3003, 5'-TCAGTCCAGCTGTCTTTTTTCTGGC;3309-3287를 사용하여 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems, Warrington, UK)를 이용하여 sequencing PCR을 수행하였다. 반응조건은 1.5 μ l의 정제된 DNA, 1.5 μ l의 premixture, 10pmol/ml의 0.5 μ l sequencing primer, 그리고 6.5 μ l의 멸균증류수를 첨가하여 96 $^{\circ}$ C 1분간 1 cycle, 그리고 96 $^{\circ}$ C 10초, 50 $^{\circ}$ C 5초, 60 $^{\circ}$ C 4분간 25 cycle을 수행하여 DNA를 증폭시켰다. 증폭된 DNA 산물에 12 μ l의 멸균증류수와 12 μ l의 3M sodium acetate 및 absolute ethanol 2 volume(50 μ l)을 첨가하고 원심분리하여 침전시켰고 이후 300 μ l의 70% ethanol 2 volume(50 μ l)을 첨가하고 원심분리하여 침전시켰고 이후 300 μ l의 70% ethanol을 첨가하여 세척한 후 원심분리하여 건조시켰다. 완전히 건조시킨 후 sequencing dye 2 μ l을 첨가하여 잘 혼합한 후 90 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 denaturation 시킨 다음 automated 3100 Genetic Analyzer(AB applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 fluorescent-labelled dye terminator 방법에 의해 염기서열을 결정하였다.

사. 결과 분석

International AIDS Society-USA panel에서 추천하는 reverse transcriptase 와 protease 에 대한 내성 유전자 부위를 참고로 하여 결정된 염기서열을 분석하고 돌연변이가 관찰되면 항레트로바이러스제의 내성이 발현한 것으로 본다. 내성부위는 nucleoside reverse transcriptase inhibitor(NRTI), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), protease inhibitor (PI)로 나누어 비교 하였다.

III. 결 과

1. 검사 대상자

2002년에서 2005년까지 항레트로바이러스제 치료 경험이 없는 10명의 HIV 감염자(남자 9명, 여자 1명, 평균 연령 32.4세)의 혈장으로 자체 개발된 유전형 내성검사법을 시행하였다. HXB2 reference sequence (Gene Bank accesssion number K03455) 에 비교해보면 10명의 검체는 모두 HIV-1 subtype B 와 유사한 sequence를 보였다. 10명의 감염자 중 6 예는 동성간의 성접촉에 의해 감염되었으며, 4 예는 이성간의 성접촉으로 감염되었다. 감염이 이루어진 장소는 국내가 8예이며, 국외가 2예이었다. 대상자는 치료 경험이 없는 감염자로서 내원시 CD4 T 세포수가 50~400 cells/ml 이었으며, HIV RNA는 대부분 5000 copies/ml 이상이였다.

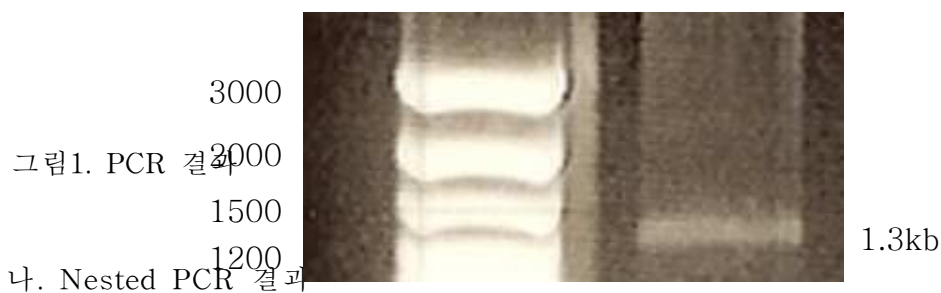
표4. 검사대상자의 주요 특성

감염자	CD4 (cell/ml)	성별	연령	HIVRNA (copies/ml)
1	264	남	22	13000
2	421	남	29	26000
3	259	남	30	24000
4	221	남	34	7300
5	236	남	34	3600000
6	55	남	41	1600000
7	407	남	30	2700
8	65	여	41	3600
9	376	남	33	310
10	305	남	30	26000

2. 유전형 내성 검사법 결과

가. RT-PCR 결과

RT-PCR 후에 1% agarose gel에서 TAE buffer로 80V에 40분간 전기영동한 후, ethidiumbromide 용액($0.5 \mu\text{l}/\text{ml}$)으로 염색하여 UV transilluminator을 이용하여 band를 확인하였다. 1.3 kb의 size를 가진 band가 나타났다. 이 band로 PR-01, RY-01의 primer RY-02, RY-03의 primer RY-04, RT-20의 primer 로 nested PCR을 수행하였다.



nested PCR 후에 1% agarose gel에서 TAE buffer로 80V에 40분간 전기영동한 후, ethidiumbromide 용액($0.5 \mu\text{l}/\text{ml}$)으로 염색하여 UV transilluminator을 이용하여 band를 확인하였다. 3 set 의 primer 로 수행하였고 size 는 각각 500 bp, 600 bp, 700 bp 이다. (1.3 kb에 해당하는 PCR product 를 일부분을 겹치게 하여 primer 를 짜서 total base pair 가 1.3 kb 이상이다.)

n1 n2 n3



그림2. nPCR 결과

3. 내성 양상

일반적으로 NRTI 에 대한 내성과 관련이 있는 돌연변이에는 M41L, K70R, T69S, L74V, V118I, Q151M, M184V, L210W, T215Y 등이 있으며, NNRTI 내성 돌연변이는 역전사효소 유전자의 codons 100-108 과 codons 179-190의 두 부분에서 일어난다. 가장 흔한 돌연변이는 efavirenz (EFV), delavirdine (DLV)과 nevirapine (NVP)에 의해 유도되는 K103N 돌연변이와 DLV와 NVP에 의한 Y181C 돌연변이다. PI에 대한 내성과 관련이 있는 돌연변이에는 L10I, M36I, G48V, I54V, A71V, V77I, V82A, I84V, L90M 등이 있다. Minor resistance gene은 단독으로 내성을 유발하지 못하고 다른 내성 유전자와 같이 발현되었을 경우에만 내성에 영향을 끼칠 수 있고, major resistance gene은 하나로도 내성에 영향을 끼칠 수 있다.

10명의 감염자 중 1,3,4번의 3 예는 내성이 없었으며, 그 외 7 예에서 내성이 존재하였는데, NRTI에 V118I와 PI minor에 L10I, M36I, A71V, V77I가 나왔다. 2번 감염자는 NRTI 와 PI minor부분에서 모두 내성을 나타냈으며, gene position은 V118I, V77I, A71V이다. 5번과 7번

감염자는 M36I에서만 내성을 나타내었고, 6번 감염자는 L10I, M36I에 내성을 나타냈으며, 8번 감염자는 V118I, L10I, M36I에 내성을 보였다. 9번 감염자는 V77I에 10번 감염자는 L10I에 내성을 나타냈다.

이들 검사결과와 기존의 상품화된 Abbott사의 ViroSeq® kit에 의한 검사를 실시하여 비교한 결과 100% 일치하였다.

표5. 검사대상자의 내성 양상

감염자	NRTI	NNRTI	PI
1	-	-	-
2	V118I	-	A71V,V77I
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	M36I
6	-	-	L10I,M36I
7	-	-	M36I
8	V118I	-	L10I,M36I
9	-	-	V77I
10	-	-	L10I

IV 고찰

미국 Department of Health and Human Services (DHHS)의 HIV 감염 치료 지침을 참고하면 항레트로바이러스제 내성 분석을 임상에 사용하기를 권장하고 있다.³³

항HIV 약제 내성은 유전형 내성분석법과 표현형 내성분석법을 조사하여 내성의 정도 및 특성을 분석한다. HIV-1의 유전자를 결정하는 특이 염기 서열이 바이러스의 유전형을 구성하므로 약제 내성의 유전형 내성분석은 단백질 분해효소와 역전사효소 유전자의 염기서열을 조사하는 것이다. 혈청내에 존재하는 바이러스 RNA 혹은 DNA로부터 RT-PCR 혹은 PCR에 의해 HIV-1의 단백질 분해효소와 역전사효소 유전자를 증폭하여 단백질 분해효소-역전사효소 유전자의 염기서열을 자동 분석하거나 line probe assay (LiPA)와 같은 hybridization based assay에 의한 probing 등에 의하여 검사한다. 보통 염기서열 자동 분석 결과는 전체 단백질 분해효소와 역전사효소 유전자에 대한 전반적인 자료를 알 수 있는데 임상에서 유용한 자료로 활용 가능하다. LiPA 등은 약제 내성과 관련이 있는 일부 특정한 codon에 관한 자료만을 제공한다.

바이러스 분리주의 특징과 성장 특성을 표현형이라고 하며 약제 내성과 연관된 표현형은 저해하는 특정 약제에 대한 HIV-1의 감수성을 말한다. 약제 감수성은 시험관 내에서 바이러스 생성을 50%, 90%, 혹은 95% 저해하는데 필요한 약제의 농도로 정의된다. (IC50, IC90, 혹은 IC95). HIV-1의 약제 감수성 분석을 위해서는 바이러스 분리주의 고농도 원액을 만들어야 한다. 이 작업은 일이 많고 많은 시간이 소요되어 결과를 얻기까지 6 내지 8 주가 걸린다. 처음 (primary) 분리주는 PBMC에서 잘 자

라므로 lectin으로 활성화시킨 HIV 항체 음성 공혈자의 PBMC를 이용한 다. 근래 약제 내성의 표현형 내성분석법으로 recombinant virus assay가 개발되어 널리 사용되고 있다. Recombinant virus assay에서 혈청내 HIV-1 RNA에서 단백질 분해효소와 역전사효소 유전자를 증폭하여, 해당 유전자가 결실된 HIV-1 molecular clone에 삽입하여 만들어진 recombinant virus는 환자의 바이러스에 있는 단백질 분해효소와 역전사효소 유전자를 가지게 된다. 이러한 접근은 바이러스 분리주를 확보해야 하는 수고를 덜어주므로 시간을 단축할 수 있다. 그리고 recombinant virus가 삽입한 유전자를 제외한 부분에 있어서는 동일한 구조를 가지므로 실험간의 차이를 최소화 할 수 있다. 일반적으로 control보다 IC50이 4배 이상 높은 분리주는 그 약제에 대한 내성이 있음을 시사한다.

이러한 유전형 내성분석법과 표현형 내성분석법은 서로 상호 보완적인 정보를 제공한다. 특히 내성 변이주가 존재하는 바이러스의 다양한 변종들이 20% 미만을 구성할 때는 대부분의 유전형 내성분석법과 표현형 내성분석법에 의해 검출되지 않을 수도 있다. 단백질 분해효소와 역전사효소 유전자를 증폭하는 RT-PCR에서는 혈청내 HIV RNA가 1000 copies/ml 이하일 경우 믿을 만한 결과를 얻기 어렵다.

유전형 내성분석법은 표현형 내성분석법보다 비교적 더 빠르고 용이하여 신속한 결과를 얻을 수 있고 경비가 적게 든다. 그리고 약제에 대한 감수성의 변화가 확실히 나타나기 전에 가능성 있는 보초 돌연변이(sentinel mutation)를 검출할 수도 있다. 특정 약제에 대한 내성과 관련이 있는 새로운 돌연변이를 검출하는 데 전체적인 염기서열 분석이 매우 중요하지만 그것은 관련 정보가 알려진 후에야 임상학적으로 유용하다. 유전형 내성분석법의 중요한 제한점은 돌연변이간의 상호작용이 표현형 내

성분석법에 미치는 결과를 예측하지 못한다는 것이다. 또한 단백질 분해 효소 억제제와 같은 특정 군에 속하는 약제간의 교차내성의 정도를 유전형 내성분석법에 의해서만 분석할 경우 결과를 예측하기 어려울 수도 있다. 표현형 내성분석법은 특정 약제에 대한 내성의 유전적 근거가 밝혀지지 않았더라도 감수성 자료를 제공할 수 있다. 그러나 분리주를 감수성 혹은 내성으로 분류하는 분기점은 대부분의 항레트로바이러스제에 있어 확립되거나 임상적으로 확인되지 않았다. 표현형 내성분석법은 약제 감수성과 교차 내성에 대한 다른 돌연변이들의 영향을 결정할 수 있다. 그러나 중요한 단점은 유전형 내성분석법에 비해 시행 가능한 실험실의 수가 많지 않으며, 경비가 더 들고, 결과를 얻기까지 걸리는 시간이 길다는 것인데, recombinant virus assay의 도입에도 불구하고 수주일이 소요된다.

현재 유전형 내성분석법을 이용한 상품화된 kit에는 Bayer사의 trugen® 과 Abbott 사의 ViroSeq® 가 있지만, 상품화된 kit의 가격은 trugen®의 경우 한 검사당 40만원 정도이며, ViroSeq®의 경우 한 검사당 30만원 정도로 너무 비싸서 임상적으로 이용하는데 제한이 된다. 그러므로 내성검사의 시행이 상용화되기 위해서는 자체 개발이 필요하다. 따라서 본 연구를 통해서 이러한 비싼 상품화된 kit에 비해 경제적이며 신속하게 이용할 수 있는 유전형 내성분석법을 자체 고안 하였다.

자체 개발한 유전형 내성검사법을 시행한 10 예에서는 Abbott 사의 ViroSeq®로 시행한 결과 100% 일치했다. 이는 실험실에서 고안한 유전형 내성분석법을 이용해서 임상에 적용해도 무리가 없음을 시사해 준다.

실험실에서 고안한 유전형 내성분석법을 이용했을 경우, RNA extract 한 후 RT-PCR 하고 nested PCR 하는데까지 걸린 시간은 7시간 밖에 걸리지 않는다. 하지만 상품화된 kit 를 이용하면 1단계마다 걸리는 시간이

길어서 24시간 안에 실험을 끝내기 힘들며, 자체 개발된 유전형 내성분석법에 비해 많은 실험단계로 인해 번거롭다. 그리고 elution 단계에서 1.3 kb를 nested PCR한 후 3 부분으로 나누어 3개만 elution해서 sequencing하면 되므로 간편하지만 상품화된 kit는 이 단계에서 7 부분으로 나누어서 sequencing을 하므로 더 많은 시간이 소요된다. 그러나 상품화된 kit는 PCR 단계에서 필요한 모든 시약들이 mixture 되어 있으므로 손쉽게 할 수 있지만, 실험실에서 고안한 유전형 내성분석법은 Taq에 영향을 많이 받는 관계로 dNTP, $MgCl_2$ 등의 시약을 직접 넣어서 mixer해야 했으므로 번거로움이 있었다.

상품화된 kit와 자체 개발한 유전형 내성분석법을 비교해 보았을 때 각기 장단점이 있지만, 자체 개발한 유전형 내성분석법의 경우는 경제적인 비용 절감과 시간을 단축함으로써 환자의 부담감을 줄여서 내성검사를 시행하는 것이 가능해 질 것으로 생각된다.

V 결론

현재 HIV 치료에 통용되고 있는 방법으로는 3가지 혹은 4가지의 항레트로바이러스제를 혼합해서 사용하는 highly active antiretroviral therapy (HAART)이다. HAART에 의해 바이러스 양이 현저히 감소하고, 면역기능이 회복되면서 기회감염 및 사망률이 크게 저하되었지만, 장기간의 치료제 복용으로 바이러스의 불완전한 억제로 인하여 내성이 발현되고, 또한 여러 부작용들로 인해 치료가 지속적으로 이루어지지 않아 내성이 발현되기 때문에 치료 실패시 재치료를 경우 내성검사가 요구된다. 그리고 초기 환자의 경우는 환자가 갖고 있는 고유한 내성과 관련된 유전자를 알고 치료에 임하면 내성의 유발로 인한 치료 실패를 예방 할 수 있다.

내성을 분석하는 방법으로는 유전형 내성분석법(genotyping resistance test)과 표현형 내성분석법(phenotyping resistance test)이 있다.

유전형 내성분석법을 이용한 상품화된 kit에는 Bayer사의 trugen® 과 Abbott 사의 ViroSeq® 가 있지만, 상품화된 kit 는 가격이 너무 비싸서 임상적으로 이용하는데 한계가 있다. 본 연구는 실험실 내에서 유전형 내성분석법을 자체 개발함으로써, 환자의 치료에 도움이 되는 내성검사를 경제적으로 이용하는데 의의와 목적이 있다.

연세대학교 의과대학 세브란스 병원에 내원한 항레트로바이러스제의 치료 경험이 없는 10명의 감염자(남자 9명, 여자 1명, 평균 연령32.4세)의 혈장으로 자체 개발한 유전형 내성검사법을 시행하였다. 그 결과 NRTI에 대한 내성과 관련이 있는 돌연변이에는 V118I가 나왔으며, NNRTI는 아무것도 나오지 않았으며, PI minor에 L10I, M36I, A71V, V77I 가 나왔다. 상품화된 kit를 이용해 같은 검체로 유전형 내성검사법을 실시해 본

결과 100% 일치했다.

자체 개발한 유전형 내성분석법의 경우는 경제적인 비용 절감으로 환자의 부담감을 줄임으로써 내성검사를 시행하는 것이 가능해 질것으로 생각되며, 치료에 도움을 줄 수 있다고 본다.

참고 문헌

1. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med 1998;338:853-60
2. Murphy EL, Collier AC, Kalish LA, Assmann SF, Para MF, Flanigan TP, et al. Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease. Ann Intern Med 2001;135:17-26
3. Hong SK, Park YS, Cho JH, Roh HJ, Kim HY, Chang KH, et al. Antiviral effect and safety of triple combination therapy in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons. Korean J Intern Med 2000;58(5):582-9
4. Lorenzi P, Opravil M, Hirschel B, Hodel JP, Furrer HJ, Sax H, et al.

Impact of drug resistance mutations on virologic response to salvage therapy: Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* 1999;13:F17-21.

5. Lee KS, Chang KH, Choi JY, Park YS, Han SH, Chin BS, et al. Adverse Effects of Antiretroviral Drugs on HIV-infected Koreans. *Korean J Infect Dis* 2003;35(2):71-7

6. Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, et al. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: A randomized study(ARGENTA). *AIDS* 2002;16(3):369-79.

7. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: The VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353(9171):2195-9.

8. Devereux HL, Youle M, Johnson MA, Loveday C. Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. *AIDS* 1999;13(18):F123-7.
9. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciann P, Gonzalez J, et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 2002;16(2):209-18.
10. Verhofstede C, Wanzele FV, Van Der Gucht B, De Cabooter N, Plum J. Interruption of reverse transcriptase inhibitors or a switch from reverse transcriptase to protease inhibitors resulted in a fast reappearance of virus strains with a reverse transcriptase inhibitors resulted in a fast reappearance of virus strains with a reverse transcriptase inhibitor-sensitive genotype. *AIDS* 1999;13(18):2541-6.
11. Miller V, Havin C, Hertogs K, Bloor S, Martinez-Picado J, D'Aquila R, et al. Virological and immunological effects of treatment interruptions in HIV-1 infected patients with treatment failure. *AIDS* 2000;14(18):2857-67.

12. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, et al. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 2000;14(9):F83-93.
13. Cohen CJ, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, et al. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* 2002;16(4):579-88.
14. Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert L, Race E, Descamps D, Peytavin G, et al. Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS* 2002;16(5):727-36.
15. Little SH, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002;347(6):385-94.

16. Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, et al. SPREAD Programme. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005;192:958-66.
17. Kuritzkes D: Clinical Implications of Antiretroviral resistance, *HIV Clinical Management*. 1997;13
18. Schuitemaker H, et al.: Biological phenotype of human Immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: Progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to t-cell-tropic virus populations, *J. Virol.* 1992;66:1354-60
19. Koot M et al.: Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4⁺ cell depletion and progression to AIDS, *Ann. Intern. Med.* 1993;118:681-8

20. Boucher CAB et al.: Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects, J. Infect. Dis. 1992;165:105-10
21. Harrigan PR et al.: Significance of amino acid variation at human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase residue 210 for zidovudine susceptibility, J. Virol.1996;70:5930-4
22. Kaye S, Loveday C, Tedder RS: A microtiter format point mutation assay: application to the detection of drug resistance in human immunodeficiency virus type-1 infected patients treated with zidovudine, J. Med. Virol. 1992;37:241-6
23. Japour AJ et al.: A standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for the determination of drug susceptibility of clinical human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) isolates, Antimicrob. Agents Chemother. 1993;37:1095-101

24. Hertogs K, de Bethune MP, Miller V: A rapid method for simultaneous detection of phenotype resistance to inhibitors of reverse transcriptase and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*1998;42:269-76

25. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, et al. The efficacy of zidovudine(AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS related complex. *N Engl J Med* 1987;317:185-91.

26. Delta Coordinating Committee. Delta: A randomized double blind controlled trial comparing combinations of zidovudine plus didanosine or zalcitabine with zidovudine alone in HIV infected individuals. *Lancet* 1996;348:283-91.

27. Caesar Coordinating Committee. Randomized trial of addition of lamivudine or lamivudine plus didanosine to zidovudine-containing

regimens for patients with HIV-1 infections: The CAESAR trials. Lancet 1997;349:1413-21.

28. Chang KH, Kang C, Hong SK, Nam JG, Kim SS, Song YG, et al. A study on emerging infectious diseases in Korea: Prevalence of genotypic resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors in Korea. Good Health R and D Project, Ministry of Health and Welfare, R.O.K. 2002;224-34.

29. Sung HS, Foley BT, Ahn SH, Kim YB, Chae JD, Shin YO, et al. Natural polymorphisms of protease in protease inhibitor-naïve HIV-1 infected patients in Korea: A novel L63M in subtype B. AIDS Res Hum Retroviruses 2003;19:525-30.

30. Sung HS, Foley BT, Bae IG, Chi HS, Cho YK. Phylogenetic analysis of reverse transcriptase in antiretroviral drug-naïve Korean HIV type 1 Patients. AIDS Res Hum Retroviruses 2001;17:1549-54.

31. Park SW, Kim HB, Choi YJ, Kim NJ, Oh MD, Choe KW. Genotypic resistance of antiretroviral drugs among drug-naïve HIV type 1 patients with the background of long-term access-easy zidovudine therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:1039-43.
32. Kim NJ, Choi ES, Kim ES, Lee DH, Choe YJ, Bang JH, et al. Prevalence of Zidovudine Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Zidovudine-naïve Patients. *Korean JJ Infect Dis* 2001;33(1):40-5.
33. Temesgen Z, [Warnke D](#), [Kasten MJ](#). Current status of antiretroviral therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2006 Aug;7(12):1541-54
-

Abstact

Research of the antiretroviral agents resistance
by genotyping in HIV-infected patients.

Ri Youn Kim

*Department of Medical Science
The Grduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor June Myung Kim)

Since 1987, it has been reported that the zidovudine has positive effect to treat human immunodeficiency virus(HIV), the treatment that uses another drug with the zidovudine was carried out in 1991. And in 1995, the protease inhibitor(PI) that controls to treat Gag and Gag-Pol poly protein precursor was introduced and highly active antiretroviral therapy (HAART) was conducted with those drugs.

A virus quantity is remarkably reduced and immunity ability is recovered by HAART, which opportunistic infection and the death-rate were fallen greatly. However, the drug-resistance is revealed due to incomplete suppression of the virus caused by taking medicine during a long term and due to discontinued treatment caused by side effects. Therefore, the resistance test is recently required not olny the case of a treatment failure , but also the case of the early HIV patient.

There is the method to analyze the drug-resistance of a antiretroviral agents such as genotyping resistance test, phenotyping resistance test. Genotyping is the method that find out the existence of an resistance

mutation analyze the sequence of HIV gene related the reverse transcriptase and protease. Phenotyping is the method that analyzes proliferous ability of the virus.

At the moment, fee of the kit produced genotyping is many problems in using to patients because there is the number of HIV patients in the developing country gets an absolute majority. Therefore, this study was designed to develop genotyping made by myself in laboratory to help economical treatment of patients.

This study analyzed an resistance aspect by using the genotyping to the AIDS patients of 10 persons (male 9, female 1, average age 32.4) who had not experienced antiretroviral therapy. In 10 persons, V118I of NRTI appeared the positive reaction of 2 persons, NNRTI did not appear any result and L10I, M36I, A71V/T, V77I of PI minor appeared the positive reaction of 7 persons.

And the commercial kit was compared with the genotyping result, which corresponds completely. Therefore, the developed genotyping applies to the patients, which can have more benefit because it is possible to test more economical and rapid than the commercail kit.

Key Words: human immunodeficiency virus(HIV), HIV infection, antiretroviral therapy(ART), acquired immune deficiency syndrome (AIDS), genotyping resistance test, drug resistance
