만성 B형간염 환자에서 엔테카비어 투여 후 발생한 유전자형 내성

충북대학교 의과대학 내과학교실, 진 매트릭스¹

김병욱 · 구자충 · 박병출 · 김수옥¹ · 홍선표¹
정지인 · 채희복 · 박선미 · 윤세진

Abstract

Genotypic resistance to entecavir in chronic hepatitis B patients

Byeong Uk Kim, M.D., Ja Chung Goo, M.D., Byeong Chul Park, M.D.,
Soo Ok Kim, Ph.D.¹, Sun Pyo Hong, Ph.D.¹, Jee In Jeong, M.D.,
Hee Bok Chae, M.D., Seon Mee Park, M.D., Sei Jin Youn, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea,
¹GeneMatrix Inc., Yongin, Korea

Background/Aims: The prevalence and clinical characteristics of entecavir (ETV) resistance is not well known. The aim of this study was to determine the frequency of genotypic resistance in nonresponders and virologic breakthrough (VBT) patients. **Methods:** The medical records of 76 chronic hepatitis B patients treated for a least 6 months from October 2006 to October 2008 were reviewed retrospectively. We divided patients into two groups: nucleoside analogue (NA)-naïve patients ($n=38$) and LAM experienced patients ($n=38$). NA-naïve and LAM experienced patients received ETV at 0.5 and 1.0 mg/day, respectively. The virologic response and VBT were investigated in both groups. We used the multiplex restriction fragment mass polymorphism (RFMP) method to test genotypic resistance at the rtI169, rtT184, rtS202, rtM204, and rtM250 sites. **Results:** Age, gender, serum ALT, and HBV DNA level before treatment did not differ between the groups. Neither VBT nor nonresponse was observed in the NA-naïve group, whereas VBT and nonresponse were observed in three patients each in the lamivudine (LAM)-experienced group; all six patients had YMDD mutation at study enrollment, all three patients with VBT had genotypic resistance to ETV, but the three nonresponse patients did not have genotypic resistance to ETV. **Conclusions:** We suspect that VBT is mostly associated with genotypic resistance to ETV. However, nonresponse might be associated with the continuance or reselection of the YMDD mutant in LAM-experienced patients. (Korean J Hepatol 2010;16:147-157)

Key words: Entecavir; Virologic breakthrough; Non-response; Genotypic resistance

◇ Received January 28, 2010; revised May 5, 2010; accepted May 19, 2010

◇ Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; DNA deoxyribonucleic acid; PCR polymerase chain reaction; ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; LAM, lamivudine; RFMP, restriction fragment mass polymorphism

◇ Corresponding author: Hee Bok Chae, E-mail: hbchae@chungbuk.ac.kr; Phone: 043) 269-6363; Fax: 043) 273-3252

주소: 충청북도 청주시 흥덕구 성봉로 410 충북대학교 의과대학 내과학교실 (우)361-711

서 론

만성 B형간염은 경과 중 면역제거기(immune clearance)가 되면 항바이러스제 혹은 인터페론과 같은 면역조절치료가 필요하게 된다. 이 중에서 항바이러스제로 사용되고 있는 약제들로서는 라미부딘, 클레부딘, 텔비부딘, 아데포비어, 엔테카비어가 우리나라에서 현재 쓰이고 있으며, 테노포비어는 유럽과 미국 등지에서 그 탁월한 효능을 인정받고 있다. 최근 많이 사용되고 있는 엔테카비어(entecavir)는 데옥시구아노신 유도체로서 야생형 바이러스에 대해 라미부딘이나 아데포비어보다 100배 이상 더 강력한 항바이러스 효과를 보이며 라미부딘이나 아데포비어 내성 바이러스에도 억제능을 가지고 있다.¹ 만성 B형간염 치료에 사용되는 항바이러스 치료제는 바이러스를 제거하기보다는 억제하는 효능을 가지기 때문에, 중단하는 경우 재발이 흔하게 발생하여 장기간 투여가 불가피하며 약제 내성이 발생할 가능성이 증가하게 된다.² 약제 내성은 바이러스 돌과현상과 생화학적 돌과현상으로 이어지며 혹은 바이러스 약제에 대한 반응이 거의 없는 치료실패를 야기하여 기존의 간염을 악화 또는 진행시킨다. 치료의 최종 결과를 결정하는 데 약제 내성의 발생은 매우 중요한 영향을 끼친다.³⁻⁵ 다른 항바이러스제와 마찬가지로 엔테카비어도 내성이 발생하는데, 엔테카비어에 내성이 발생하기 위해서는 라미부딘 내성과 관련된 유전자가 포함되어야 하고, rtI169T, rtT184S, rtS202G, rtM250V 위 4개의 변이 중 한 가지가 추가되어야 유전자형 내성을 획득하게 된다.^{6,7} 따라서, 초치료 환자에서는 두 가지 변이가 모두 발생해야 하므로 유전자 장벽이 높기 때문에 내성이 매우 드물지만 라미부딘 내성 환자에서는 한 가지 변이만 추가되면 내성이 발생하기 때문에 흔히 발생한다.

우리나라에서는 2007년 3월부터 엔테카비어가 시판되기 시작하여 3년째를 넘고 있다. 장기간 투약에 따른 치료효능의 유지, 약제 내성의 발생빈도, 타약제 내성 유발 돌연변이 양상과 엔테카비어 치료효과 등에 관한 연구가 절실하게 필요한 시점으

로 아직까지 엔테카비어의 내성에 대한 연구가 부족한 실정이다. 이에 저자들은 엔테카비어로 치료받고 있는 만성 B형간염 환자에서 바이러스 돌과 현상이나 치료실패가 발생하는 것을 살펴보고 유전자형 내성과 어떠한 관계가 있는지에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2006년 10월부터 2008년 10월까지 충북대학교병원에 내원하여 엔테카비어 치료를 시작한 만성 B형간염 환자를 대상으로 하였고, 총 103명의 환자가 등록되었다. 이 중 최소한 6개월 이상 엔테카비어 투여를 받고 혈청검사로 추적이 가능하였던 환자 76명을 선별하였는데, 38명은 항바이러스치료를 받은 적이 없는 환자였고, 나머지 38명은 이전에 라미부딘 치료를 받은 병력이 있는 환자였다. 전자를 초치료군으로, 후자를 라미부딘 치료경험군으로 분류하였다. 라미부딘 치료경험군 중에서 라미부딘 내성이 확인되었던 환자는 20명이었고, 나머지 18명은 현재 우리나라 항바이러스제 치료의 보험기준인, HBV DNA가 최저점(nadir)에 도달 후 2회 이상 바이러스 돌과현상이 발견되면 인정한다는 기준에 따라서 그에 합당하였기에 엔테카비어로 교체한 환자였다. 또한, 라미부딘 치료경험군에는 라미부딘-아데포비어의 순차적 치료에도 불응하여 엔테카비어로 약제를 전환한 환자 15명이 포함되었다.

초치료군은 HBV DNA가 HBeAg 양성인 경우 $\geq 10^5$ copies/ml, HBeAg 음성인 경우 $\geq 10^4$ copies/mL이고 AST 또는 ALT치가 정상 상한치의 두 배 이상일 때 치료를 시작하였으며, 대상성 간경변증인 경우는 HBeAg 유무에 상관없이 혈청 HBV DNA가 10^4 copies/mL이고 혈청 AST 또는 ALT가 정상 상한치 이상이면 치료를 시작하였다. 라미부딘 치료경험군은 모두가 라미부딘으로 치료 중이거나 치료를 받았던 기왕력이 있으며, 이후 라미부딘이나 아데포비어 투여 중 치료에 대한 반응이

없거나 바이러스 돌과현상이나 생화학적 돌과현상이 관찰되었을 때 엔테카비어로 전환하였다. 약물의 투여량은 초치료군에서 엔테카비어 0.5 mg/일이고, 라미부딘 치료경험군에서는 엔테카비어 1.0 mg/일이었다. 비대상성 간경변 환자는 본 연구에 포함되지 않았으며, C형간염, 알코올간염, 자가면역간염, 기타 담도질환 등은 제외하였다.

2. 실험방법

환자들은 투약 전과 투약 후 3개월 간격으로 혈청 ALT와 HBV DNA level을 측정하였다. HBV DNA는 실시간 중합효소연쇄반응법(real time-PCR) (SamKwang medical laboratories, Seoul, Korea)으로 정량하였으며 최소 70 copies/mL까지 검출이 가능하였다.

혈액검사 시행 시 환자들의 동의하에 추가적인 혈액표본을 채취하여 냉동고에 -80°C 로 보관하였다. 혈액 HBV DNA 추적 검사 소견을 검토하여 바이러스 돌과현상과 치료실패를 보인 혈액표본을 선별하였고, 엔테카비어 유전자형 내성을 알아보기 위해 제한효소 분절질량 다형성(restriction fragment mass polymorphism, RFMP) 분석(Genemetrics, Youngin, Korea)을 시행하였다.

3. 용어의 정의

엔테카비어에 대한 바이러스 반응(Virologic response)은 엔테카비어 투여 6개월 후에 HBV DNA가 10^4 copies/mL 미만으로 검출되는 경우로 정의하였다. 엔테카비어 치료 중 바이러스 반응을 보였다가 이후 혈청 HBV DNA가 최저치에서 10배 이상 증가한 것을 바이러스 돌과현상(Virologic breakthrough)으로 정의하였으며, 엔테카비어 6개월 투여 후에도 혈청 HBV DNA가 치료 전에 비해 2 log 이상 감소하지 않는 경우를 치료실패(non-response)로 정의하였다.

4. RFMP 분석⁸

Type IIS 제한효소 인지 부위(GGATG;*FokI*)를 포함한 HBV P 유전자의 YMDD motif(rtM204의 ATG codon)의 8번째 전 염기에 결합하도록 제작

된 특수 시발체를 이용하여 중합연쇄반응을 하고, 해당 제한효소로 절단하면 YMDD motif를 포함하는 7mer와 13mer의 올리고머가 형성된다. 이 두 가지의 올리고머는 YMDD motif에 나타나는 돌연변이의 종류에 따라 특정 질량을 가지게 되는데, 이 두 올리고머를 말디토프 질량분석기(MALDI-TOF Mass spectrometry, Biflex IV;Bruker Daltonics, Billerica, MA)를 이용해 질량 분포를 지연 추출 모드로 얻은 다음, 각 20~50개의 레이저 파동으로부터 time-of-flight 자료를 transient digitizer에서 기록하여 평균으로 환산된 질량 분포를 자료처리 프로그램(Bruker DataAnalysis for TOF 1.6 m)을 통해 질량으로 전환하였다. 여기서 얻어진 각 질량값을 예상 질량값과 비교하여 바이러스의 변이를 찾아내었으며, 라미부딘 내성 바이러스 검출 시 사용되었던 단일 분석 방법을 응용하여 rtI169, rtT184, rtS202, rtM204, rtM250 등 한 번에 여러 코돈 부위의 바이러스 변이를 검출할 수 있는 다중 RFMP 분석법이 사용되었다.

5. 통계 분석

통계 분석은 SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였으며, 두 군 간의 평균 비교를 위해 Chi-square test 또는 Fisher's exact test와 Student's *t*-test를 이용하였다. 엔테카비어 내성의 누적발생률을 알아보기 위해 Kaplan-Meier법을 사용하였다. *P*값이 0.05 이하인 것을 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 대상 환자들의 특성

대상 환자들의 연령은 초치료군이 평균 43세, 라미부딘 치료경험군은 45세였다. 초치료군 38명 중 31명(82%)이 남성이었고 라미부딘 치료경험군에서는 25명(66%)이었다. 초치료군과 라미부딘 경험군에서 치료 전 평균 ALT 값은 각각 159, 131 IU/L였으며, 평균 HBV DNA 값은 8.1, 7.8 log₁₀ copies/mL이었다. 치료 전 HBeAg 양성 환자는 초치료군에

서 19명(50%), 라미부딘 치료경험군에서 31명(82%) 이었고, 간경변 환자는 각각 20명(53%), 13명(34%) 이었다. 엔테카비어를 투여한 평균 기간은 초치료 군 15개월(범위 6~28개월), 라미부딘 치료경험군 13개월(6~24개월)로 거의 대부분 2년 미만이었다. 라미부딘 치료경험군에서 라미부딘만 사용했던 환자는 23명(60%)이었고, 라미부딘-아데포비어의 순차적 치료를 하였던 환자는 15명(40%)이었다. 또한, 라미부딘 치료경험군에서 라미부딘 내성검사를 통해 내성 여부가 확인된 환자는 20명(53%)이었고, 나머지 18명은 라미부딘 사용 중 바이러스 돌파현상이 두 번 이상 확인되어 아데포비어로 전환하거나 엔테카비어로 전환한 환자들이었다. 라미부딘 치료경험군에서 HBeAg 양성이 많았던 것 ($P=0.004$) 이외에는 두 군 간의 특성에서 통계적으

로 유의한 차이는 없었다(표 1).

2. 엔테카비어 치료에 따른 바이러스 반응

엔테카비어 치료 전과 치료 6개월 후의 HBV DNA 억제 정도는 그림 1에 나타내었다. 초치료군에서는 치료 6개월 후 HBV DNA가 $-4.27 \pm 1.16 \log_{10}$ copies/mL 억제되었고, 라미부딘 치료경험군에서는 $-3.18 \pm 1.41 \log_{10}$ copies/mL 억제되어 초치료군에서 통계적으로 유의하게 HBV DNA가 더 억제되었다 ($P<0.001$).

3. 엔테카비어 치료 중 바이러스 돌파현상과 치료 실패의 발생빈도

엔테카비어 초치료군 38명 중 바이러스 돌파현상과 치료실패를 보인 환자는 한 명도 없었다. 라

Table 1. Baseline characteristics of the included patients

	No previous LAM (n=38)	Previous LAM (n=38)	P-value
Mean age $\pm$ SD, years	43 $\pm$ 10	45 $\pm$ 12	0.54 [*]
Male, No. (%)	31 (82)	25 (66)	0.12 [*]
Mean ALT $\pm$ SD, IU/L	159 $\pm$ 161	131 $\pm$ 102	0.39 [*]
Mean HBV DNA $\pm$ SD, $\log_{10}$ copies/ml	8.1 $\pm$ 8.6	7.8 $\pm$ 7.9	0.32 [*]
HBeAg-positive, No. (%)	19 (50)	31 (82)	0.004 [*]
Cirrhosis in clinical diagnosis, No. (%)	20 (53)	13 (34)	0.11 [*]
Mean duration of ETV, months (range, months)	15 $\pm$ 6 (6~28)	13 $\pm$ 6 (6~24)	0.10 [*]
Previous anti-viral therapy, No. (%)			
LAM only	-	23 (60)	-
LAM $\rightarrow$ ADV	-	15 (40)	-
LAM-resistance, No. (%)	-	20 (53)	-
rtM204V+rtL180M		9	
rtM204I+rtL180M		3	
rtM204V/I+rtL180M		3	
rtM204I		5	

* χ^2 test, ^{*} Student *t*-test. LAM, lamivudine; ETV, entecavir; ADV, adefovir; SD, standard deviation.

Table 2. Comparison of incidences of virologic breakthrough and nonresponse between the two study groups

	No previous LAM (n=38)	Previous LAM (N=38)			P-value
		Total (n=38)	LAM only (n=23)	LAM $\rightarrow$ ADV (n=15)	
Virologic breakthrough, No.(%)	0 (0.0)	3 (7.9)	2 (8.7)	1 (6.7)	1.00 [*]
Non-response, No.(%)	0 (0.0)	3 (7.9)	1 (4.3)	2 (13.3)	0.55 [*]

*Fisher's exact test. LAM, lamivudine; ADV, adefovir.

미부딘 치료경험군 38명에서는 바이러스 돌파현상이 3명(7.9%), 치료실패가 3명(7.9%)에서 나타났다. 라미부딘 치료경험군 중 라미부딘만 치료받았던 환자 23명에서는 바이러스 돌파현상이 2명, 치료실패가 1명에서 보였고, 라미부딘-아데포비어 순차적 치료를 받았던 환자 15명에서는 바이러스 돌파현상이 1명, 치료실패가 2명에서 나타났으며, 두 군 간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다(표 2).

4. 엔테카비어에 대한 유전자형 내성 조사를 위한 RFMP 분석 결과

HBV DNA 추적 검사 결과 바이러스 돌파현상을 보인 3명과 치료실패를 보인 3명에서 엔테카비어 내성 발생을 알아보기 위하여 RFMP 분석을 시행하였고, 결과는 표 3과 같다. 환자 6명 모두 엔테카비어 치료 전 rtM204V와 rtL180M의 돌연변이를 가지고 있었으며 이번 RFMP 분석에서도 모두 rtM204에 돌연변이를 가지고 있었다. 바이러스 돌파현상을 보인 환자 3명에서 환자 1은 rtT184L, 환자 2는 rtS202G의 rtM204V에 대한 추가적인 변이

가 검출되었고, 환자 3은 rtT184L, rtS202G의 두 가지 추가적인 변이가 검출되어 엔테카비어에 대한 유전자형 내성이 있음을 보여주었다. 그러나 치료 실패를 보인 3명에서는 치료 전에 있었던 rtM204V가 지속적으로 유지된 것 이외에는 추가적인 변이가 발견되지 않았다.

5. 엔테카비어 내성의 누적발생률과 엔테카비어 내성 환자들의 특성 및 경과

평균 14 ± 6 개월의 추적관찰기간 동안, 라미부딘 치료경험군에서만 3명(7.9%)의 엔테카비어 유전자형 내성이 확인되었다. 엔테카비어 유전자형 내성의 누적발생률은 12, 18, 24개월에 각각 0, 0, 19%였다(그림 2).

바이러스 돌파현상을 보인 3명은 모두 엔테카비어에 대한 유전자형 내성을 보였으며 환자 3명의 임상적 특성은 표 4에 나타내었다. 엔테카비어 내성이 발견되었던 시점은 엔테카비어 치료 후 2명은 18개월, 1명은 21개월이었다. 치료 전 HBV DNA level은 $6.3 \sim 8.0 \log_{10}$ copies/mL로 높았고, 엔테카비어 내성이 발견되었을 때 HBV DNA level은 4.9

Figure 1. Decrease in HBV DNA before and after 6 months of ETV treatment. The decrease in serum HBV DNA at 6 months was greater in the NA-naïve group than the LAM-treated group ($P < 0.001$). The bold horizontal bars in each boxes represent the mean HBV DNA level, and the thin vertical lines indicate the range of HBV DNA levels.

~5.5 log₁₀ copies/mL였다. 또, 치료 전 ALT level은 환자 1은 정상범위였다가 엔테카비어 내성 발견 시점에서는 158 IU/L로 생화학 돌과현상이 같이 동반되었으며, 환자 2, 3은 치료 전 ALT level이 각각 84, 244 IU/L로 높았는데 정상범위로 떨어지는 생화학 반응이 생겼다가 엔테카비어 내성 발견 시점에는 다시 상승하였다(그림 3). 3명의 환자 모두 라미부딘에 대한 내성으로 rtM204V, rtL180M을 가지고 있었다. 환자 1은 이전 아데포비어 사용 중 두 번의 바이러스 돌과현상이 있어 엔테카비어로 교체하였으며, 당시 아데포비어에 대한 내성검사는 시행하지 않았다. 환자들의 과거 항바이러스제 사용 기간은 환자 1은 라미부딘 15개월, 아데포비어 27개월로 비교적 장기간 항바이러스제를 사용하였고, 환자 2, 3은 라미부딘만 각각 12, 7개월로 단기간 사용되었다. 엔테카비어 내성 확인 후 구조요법으로 환자 1은 엔테카비어와 아데포비어의 병

합요법을 환자 2, 3은 라미부딘과 아데포비어의 병합요법을 사용하였는데, 환자 1은 1개월 후부터 추적관찰되지 않았고, 환자 2, 3은 각각 7, 12개월 사용하였으나 바이러스 반응이나 생화학적 반응이 일어나지 않은 상태로 추적관찰 중이다.

6. 엔테카비어 치료실패를 보인 환자들의 경과

엔테카비어 투여 6개월 후에 치료실패를 보인 환자 모두에서 그림 4와 같이 항바이러스제 구조요법을 시행하였다. 환자 4, 6은 라미부딘과 아데포비어 병합요법으로, 환자 5는 엔테카비어와 아데포비어 병합요법을 사용하였는데, 환자 5에서만 바이러스 반응을 보여 현재 지속적으로 사용하고 있으며, 환자 4, 6은 각각 9개월, 6개월 추가 사용 이후에는 약제비때문에 아데포비어만 유지하며 정기적으로 혈액검사를 실시하며 추적관찰 중이다.

Figure 2. The cumulative probabilities of ETV resistance at months 12, 18, and 24 were 0%, 0%, and 19%, respectively.

Table 3. RFMP analysis for ETV resistance

	Codon of HBV polymerase reverse transcriptase				
	rt169	rt184	rt202	rt204	rt250
Virologic breakthrough					
Patient 1	Ile	Thr→Leu	Ser	Met→Val	Met
Patient 2	Ile	Thr	Ser→Gly	Met→Val	Met
Patient 3	Ile	Thr→Leu	Ser→Gly	Met→Val,Ile	Met
Non-response					
Patient 4	Ile	Thr	Ser	Met→Val	Met
Patient 5	Ile	Thr	Ser	Met→Val	Met
Patient 6	Ile	Thr	Ser	Met→Val	Met

patient 1~6 have rtM204V+rtL180M as YMDD mutation at baseline. RFMP, restriction fragment mass polymorphism; ETV, entecavir; Ile, isoleucine; Thr, threonine; Leu, leucine; Ser, serine; Gly, glycine; Met, methionine; Val, valine.

Table 4. Summary of patients with ETV resistance

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Age (years)	54	45	48
Gender	male	female	female
At start of ETV			
HBeAg	positive	positive	positive
HBV DNA (log ₁₀ copies/ml)	6.3	8.0	8.0
ALT (IU/L)	33	84	244
YMDD mutation	rtM204V/I,rtL180M	rtM204V,rtL180M	rtM204V,rtL180M
ADV resistance	not tested		
Duration of prior LAM	15	12	7
Duration of prior ADV	27	-	-
Virologic response*	Yes	Yes	Yes
Time to detection of ETV resistance (months)	18	18	21
At time of ETV resistance			
HBV DNA (log ₁₀ copies/ml)	5.0	4.9	5.5
ALT (IU/L)	158	67	66
ETV-resistant mutation	rtT184L	rtS202G	rtT184L, rtS202G
Response to rescue therapy			
Rescue therapy	ETV+ADV	LMV+ADV	LMV+ADV
Follow-up (months)	1	7	12
Changes in HBV DNA(log ₁₀ copies/ml)	-	-0.1	-1.4
HBV DNA at last F/U(log ₁₀ copies/ml)	-	4.8	4.1
ALT at last F/U (IU/L)	-	40	85

*Virologic response defined as HBV DNA <4 log₁₀ copies/mL after 6 months of entecavir therapy. ETV, entecavir; LAM, lamivudine; ADV, adefovir.

고 찰

본 연구결과 엔테카비어 초치료군에서는 바이러스 돌파현상 혹은 치료실패는 없었다. 그러나 라미부딘 치료경험군에서는 바이러스 돌파현상이나 치료실패가 각각 3명씩(16%) 있었으며, 특히 바이러스 돌파현상을 보인 3명에서 모두 엔테카비어 유전자형 내성이 확인되었지만, 치료실패를 보인 환자에서는 유전자형 내성이 발견되지 않았다. Tenney 등에⁹ 의한 보고에서 엔테카비어 초치료군에서 5년간 바이러스 돌파현상의 누적발생률이 1.4%로 매우 낮았으며, 이 등에¹⁰ 의한 국내 연구에서도 114명의 엔테카비어 초치료 환자에서 평균 23.5개월의 치료기간 동안 바이러스 돌파현상이 관찰되지 않았다. 본 연구에서의 엔테카비어 초치료군 38명에서 바이러스 돌파현상이 없었다는 것은 이전 연구와 동일하게 초치료 환자에서 엔테카비

어 내성은 매우 드물다는 것을 알 수 있었다. 그러나 라미부딘 내성 환자에서는 엔테카비어로 치료하였을 때 바이러스 돌파현상의 누적발생률이 1, 2, 3, 4, 5년에 1.4%, 10.0%, 27.0%, 39.5%, 43.0% 사용기간이 늘어날수록 매우 증가한다.⁹ 본 연구는 38명을 대상으로 중앙값 15개월 동안 추적관찰하였을 때 바이러스 돌파현상은 7.9%이며, 3명 모두 2년 이내에 발생하였으며, 이전 Tenney 등의 연구 결과인 2년 이내 10%와 유사한 결과를 보여주고 있다.

항바이러스제 치료를 시작한 후 6개월째 혈청 HBV DNA는 장기적으로 약제의 내성을 예측할 수 있는 중요한 지표로 알려져 있으며,^{11,12} 치료실패를 판단하는 지표이기도 하다. 일차 치료실패(primary non-response)는 대한간학회(2007년)와 미국간학회(2009년)에서는 치료 6개월째 혈청 HBV DNA가 치료 전에 비해 2 log₁₀ IU/mL 이상 감소되

지 않는 경우로 정의하고 있으며,^{1,13} 유럽간학회(2009년), 아시아-태평양간학회(2008년)에서는 이와 달리 치료 3개월째 HBV DNA가 1 log 이상 감소하지 않는 경우로 정의하고 있다.^{14,15} 본 연구에서는 대한간학회와 미국간학회의 기준에 따라 치료실패를 정의하였다.

현재까지 엔테카비어로 치료받는 환자에서 치료실패의 유병률과 치료실패 시 어느 정도가 유전자형 내성이 발생하는지에 대한 자료는 없었다. 본

연구에서는 환자 수가 많지 않다는 제한점은 있으나, 치료실패는 초치료군에서 발생하지 않았고 라미부딘 치료경험군에서만 7.9%가 발생하였으며 유전자형 내성은 나타나지 않았다. 이러한 결과를 보면 치료실패는 항바이러스제에 대한 내성을 직접적으로 의미하지 않으며, 또한 항바이러스제에 대한 유전자형 내성에 의한 것도 아님을 알 수 있다. 그러나 이러한 상태가 지속됨에 따라서 향후 항바이러스제에 대한 내성 발생 위험이 증가할 우려가

Figure 3. Time courses of HBV DNA and ALT levels during ETV treatment in VBT. ETV resistance was examined in patients 1 and 2 at 18 months and in patient 3 at 21 months.

Figure 4. Time courses of HBV DNA and ALT levels during ETV and consecutive rescue therapy in nonresponse patients. Patient 5, who received ETV and adefovir, showed a virologic response.

있으므로 주의가 필요하다. 엔테카비어는 라미부딘 내성 바이러스에 대한 감수성이 야생형 바이러스에 비해 8배 정도 감소되어 있다.¹⁶ 최근의 Choe 등의¹⁷ 연구에 의하면, 이전에 rt204에 돌연변이가 있었던 18명의 환자에서 1명만이 바이러스 반응(HBV DNA<300 copies/mL)에 도달하였고, rt204에 돌연변이가 없었던 4명의 환자는 모두 바이러스 반응에 도달하였다. 또한, 라미부딘과 아데포비어에 내성이 있어 엔테카비어로 전환하였던 환자에서 rt204의 돌연변이가 치료기간이 경과함에 따라서 상대적으로 점차 늘어나는 반면, 아데포비어의 내성 부위인 rt181이나 rt236은 감소하였다. 따라서, 라미부딘 내성 환자에서 구조요법으로서의 엔테카비어 단독치료는 라미부딘 내성 바이러스가 계속 유지되거나 재선택되면서 치료효과가 상당히 감소하며, 중국에는 엔테카비어에 대한 내성을 유도하게 된다고 하였다. 마찬가지로 치료 6개월째 판정되는 치료실패는 라미부딘 내성 바이러스에 대한 엔테카비어의 바이러스 억제능이 떨어지기 때문에 단독치료로는 초기에 라미부딘 내성 바이러스가 효과적으로 억제되지 못해 계속 유지되거나 재선택되면서 발생할 수 있을 것이다.

항바이러스제에 대한 치료실패의 원인에는 내성 바이러스의 지속이나 재선택 이외에도 환자, 바이러스, 약제와 관련된 여러 요소들이 관여하고 있다.^{18,19} 항바이러스제에 대한 유전자형 내성 이외에 항바이러스제의 전구물질을 활성형으로 전환시키거나 뉴클레오사이드를 삼인산으로 인산화시키는 데 관여하는 효소의 다형성(polymorphism)이 있을 수 있고,^{20,21} 어떤 바이러스 중에는 약제에 노출된 적이 없는 경우에도 약제 치료 전부터 저항성을 보이거나 약제 감수성이 저하되어 있는 것도 있으며,²² 약제의 용량이나 약효 등과 같은 인자에 의해 영향을 받을 수 있다.

한편, 엔테카비어 유전자형 내성은 오직 바이러스 돌과현상을 보인 3명에서만 발견되었다. 3명에서 발생한 변이는 rtT184L, rtS202G가 각각 1명이고 다른 1명은 위 두 개의 돌연변이를 모두 가지고 있었으며, rtI169와 rtM250에서는 돌연변이가 발생

하지 않았다. 이러한 rtT184와 rtS202의 변이는 엔테카비어에 대한 유전자형 내성 중 엔테카비어의 약제 감수성을 감소시키는 데 가장 큰 역할을 하는 염기서열의 돌연변이로 알려져 있다.²³ Tenney 등의⁹ 보고에서 라미부딘 내성 환자를 엔테카비어 치료 시 바이러스 돌과현상의 누적발생률이 1, 2, 3, 4, 5년에 1.4%, 10.0%, 27.0%, 39.5%, 43.0%, 유전자형 내성의 누적발생률은 1, 2, 3, 4, 5년에 6%, 15%, 36%, 46%, 51%로 유전자형 내성이 바이러스 돌과현상보다 치료기간에 따라 1.2~4.3배 더 많이 발생하였으며, 대부분 유전자형 내성이 발생한 환자에서 바이러스 돌과현상이 발생하였다.

다른 연구들에서도 약제 순응도가 좋은데도 불구하고 발생한 바이러스 돌과현상의 원인은 유전자형 내성이 그 원인이라고 보고되고 있다.^{6,18,24} 따라서, 현재 치료경과 중 약제 내성을 발견하기 위해 HBV DNA값으로 바이러스 돌과현상을 모니터링하고 있는데 바이러스 돌과현상 발견 시 환자는 이미 유전자형 내성을 가지고 있다고 보아도 무방하다고 생각된다.

본 연구에서 라미부딘 단독 치료경험군과 라미부딘-아데포비어 순차적 치료경험군 사이에 엔테카비어 약제 내성 발생률 차이는 없었다. 그러나 최근 보고된 다른 연구에서는 항바이러스제를 사 용함에 있어서 처음 라미부딘에서 아데포비어 그리고 엔테카비어로 순차적으로 항바이러스제를 바꾸어 가며 치료를 하는 경우, 2가지 이상의 내성을 보이는 다약제 내성 발생 위험이 있다고 하였다.^{7,25} Shim 등의²⁶ 연구에서는 엔테카비어 48주간 치료 시 라미부딘-아데포비어 내성 환자에서 라미부딘 단독 내성 환자보다 엔테카비어의 효과가 감소하기는 하지만, 바이러스 돌과현상에서는 의미 있는 차이가 없었다고 보고하였다. 또한, 연구기간 동안 바이러스 돌과현상이 발생한 환자들을 대상으로 하여 유전자형 내성 발생 유무를 조사하였으며, 그 결과 유전자형 내성 발생에서도 역시 의미 있는 차이는 발견하지 못하였다. Shim 등은²⁶ 이러한 결과가 나온 이유에 대한 의견으로서 내성 균주는 바이러스 복제능력이 떨어지기 때문에 치료기간인 48

주 이후에 늦게 내성이 발생할 수 있어 정해진 관찰기간 내에는 정확한 내성 발생 유무를 알아내기 어렵다고 하였다. 본 연구에서도 내성 발생률의 차이는 역시 발견할 수 없었으며 향후 더 많은 환자들을 대상으로 추적기간을 더 길게 보았을 때는 다른 결과가 나올 수 있을 것이다.

본 연구의 제한점은 우선 추적관찰기간이 6~28개월 정도로 비교적 짧고 다양했던 것과 대상자 수가 적은 점 등이다. 또한, 바이러스 돌파현상이나 치료실패를 보인 환자만을 대상으로 유전자형 내성검사를 시행해 아직 바이러스 돌파현상이나 치료실패를 보이기 전의 약제 내성 발생 경우라면 본 연구에서 제외되었을 것이다. 이는 유전자형 내성의 발생빈도를 실제보다 과소평가하게 될 가능성이 있을 것이다.

결론적으로 이전 라미부딘을 사용한 환자에게 엔테카비어 사용 도중 발생하는 바이러스 돌파현상은 대부분 엔테카비어 유전자형 내성 발생과 연관되지만, 치료실패의 경우는 유전자형 내성 이외의 원인에 의하여 혈중에 라미부딘 내성 바이러스가 계속 유지되거나 재선택되는 것과 관련이 있을 것으로 추정된다.

요 약

목적: 엔테카비어는 만성 B형간염 치료제로서 강력한 항바이러스 효과와 적은 내성 발생률이 보고되고 있다. 국내에서 발표된 엔테카비어의 치료 효과에 대한 몇몇의 임상연구가 있으나 엔테카비어 내성 발생에 대한 임상연구는 아직까지 드물다. 본 연구에서는 엔테카비어로 치료받은 환자로서 경구용 항바이러스제 치료경험이 없거나 혹은 라미부딘 약제 내성 환자에서 엔테카비어 유전자형 내성 발생에 관하여 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 2006년 10월부터 2008년 10월까지 충북대병원을 내원하여 엔테카비어를 최소 6개월 이상 투여받은 만성 B형간염 환자 76명을 후향적으로 조사하였다. 환자군은 항바이러스치료를 받은 적이 없는 초

미부딘 치료경험군($n=38$)으로 분류하였으며, 라미부딘 치료경험군에는 라미부딘-아데포비어의 순차적 치료에도 불응하여 엔테카비어로 전환한 환자 15명이 포함되었다. 초치료군에서는 엔테카비어 0.5 mg/일로 투여하였고 라미부딘 치료경험군에서는 엔테카비어 1.0 mg/일로 투여하였다. HBV DNA 추적 검사 결과를 토대로 바이러스 돌파현상이 관찰된 경우와 치료실패의 경우를 선별하여 유전자형 내성 발생 여부를(rtI169, rtT184, rtS202, rtM204, rtM250) 알아보기 위해 RFMP 분석을 시행하였다. **결과:** 두 군 간의 치료 전 연령, 성별, 혈청 ALT와 HBV DNA의 차이는 없었으나 HBeAg 양성 환자는 라미부딘 치료경험군에서 통계적으로 유의하게 많았다($P=0.004$). 평균 투여 기간은 초치료군 15개월(범위, 6~28개월), 라미부딘 치료경험군 13개월(6~24개월)이었다. 바이러스 돌파현상과 치료실패는 초치료군에서는 한 예도 관찰되지 않았으나, 라미부딘 치료경험군에서는 3명(7.9%)이 관찰되었다. 바이러스 돌파현상이 발생한 3명에서는 공통적으로 rtM204V의 변이가 있었고, 한 명에서는 rtT184L, 한 명에서는 rtS202G 변이, 다른 한 명에서는 rtT184L, rtS202G의 이중 변이가 검출되어 모두 엔테카비어에 대한 유전자형 내성이 확인되었다. 이들 3명의 환자에서 엔테카비어 유전자형 내성이 발견된 시기는 엔테카비어 투여 후 두 명이 18개월, 한 명이 21개월째였다. 치료실패자에서는 rtM204V의 변이만이 관찰되었고 엔테카비어에 대한 유전자형 내성은 검출되지 않았다. **결론:** 라미부딘 내성을 경험한 환자에게 엔테카비어 사용 도중 발생하는 바이러스 돌파현상은 대부분 엔테카비어 유전자형 내성 발생과 연관되지만, 치료실패의 경우는 엔테카비어 유전자형 내성 이외의 원인에 의하여 혈중에 라미부딘 내성 바이러스가 계속 유지되거나 재선택되는 것과 관련이 있을 것으로 추정된다.

색인단어: 엔테카비어, 바이러스 돌파현상, 치료실패, 유전자형 내성

참고문헌

1. Lee KS, Kim DJ, Guideline Committee of the Korean Association for the Study of the Liver. Management of Chronic Hepatitis B: Korean J Hepatol 2007;13:447-488.
2. Zoulim F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic Hepatitis B virus infection. Antiviral Res 2004;64:1-15.
3. Delaney IV WE, Borroto-Esoda K. Therapy of chronic hepatitis B: trends and developments. Curr Opin Pharmacol 2008;8:532-540.
4. Lok AS. Navigating the Maze of Hepatitis B Treatments. Gastroenterology 2007; 132:1586-1594.
5. Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Mutimer D, et al. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. Antivir Ther 2004;9: 679-693.
6. Degertekin B, Lok AS. Monitoring antiviral resistance in patients receiving nucleos(t)ide analog therapies for hepatitis B: Which method should be used? J Hepatol 2008;48:892-894.
7. Villet S, Ollivet A, Pichoud C, Barraud L, Villeneuve JP, Trepo C, et al. Stepwise process for the development of entecavir resistance in a chronic hepatitis B virus infected patient. J Hepatol 2007;46:531-538.
8. Lee JM, Ahn SH, Chang HY, Shin JE, Kim DY, Sim MK, et al. Reappraisal of HBV genotypes and clinical significance in Koreans using MALDI-TOF mass spectrometry. Korean J Hepatol 2004;10:260-270.
9. Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. Hepatology 2009;49:1503-1514.
10. Lee MH, Lim SG, Jeon SJ, Kang CJ, Cho YJ, Kim SS, et al. Clinical efficacy of entecavir therapy and factors associated with treatment response in naive chronic hepatitis B patients. Korean J Hepatol 2009;15:446-453.
11. Sherman M, Yurdaydin C, Sollano J, Silva M, Liaw YF, Cianciara J, et al. Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. Gastroenterology 2006;130:2039-2049.
12. Keeffe EB, Zeuzem S, Koff RS, Dieterich DT, Esteban-Mur R, Gane EJ, et al. Report of an international workshop: Roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B. Clin Gastroenterol Hepatol 2007;5:890-897.
13. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. Hepatology 2009;50:1-36.
14. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. J hepatol 2009;50:227-242.
15. Liaw YF, Leung N, Kao JH, Piratvisuth T, Gane E, Han KH, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. Hepatol Int 2008;2:263-283.
16. Baldick CJ, Eggers BJ, Fang J, Levine SM, Pokornowski KA, Rose RE, et al. Hepatitis B virus quasispecies susceptibility to entecavir confirms the relationship between genotypic resistance and patient virologic response. J hepatol 2008;48:895-902.
17. Choe WH, Hong SP, Kim BK, Ko SY, Jung YK, Kim JH, et al. Evolution of hepatitis B virus mutation during entecavir rescue therapy in patients with antiviral resistance to lamivudine and adefovir. Antivir ther 2009;14:985-993.
18. Song BC. Management of chronic hepatitis B virus infection with antiviral resistance. Korean J Hepatol 2008;14:102-114.
19. Brunetto MR. New therapeutic approaches for long-term control of chronic hepatitis B. Dig Liver Dis 2009;3:67-70.
20. Eriksson S, Wang L. The role of cellular deoxynucleoside kinases in the activation of nucleoside analogs used in chemotherapy. Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy, Chu C.K. ed. Amsterdam:Elsevier, 2002:455-475.
21. Hulgán T, Haas DW. Toward a pharmacogenetic understanding of nucleotide and nucleoside analogue toxicity. J Infect Dis 2006;194:1471-1474.
22. Schildgen O, Sirma H, Funk A, Olotu C, Wend UC, Hartmann H, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. N Engl J Med 2006;354:1807-1812.
23. Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, Walsh AW, Weinheimer SP, Discotto L, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3498-3507.
24. Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral drug resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. Hepatology 2007;46:254-265.
25. Yim HJ, Hussain M, Liu Y, Wong SN, Fung SK, Lok AS. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. Hepatology 2006;44:703-712.
26. Shim JH, Suh DJ, Kim KM, Lim YS, Lee HJ, Chung YH, et al. Efficacy of entecavir in patients with chronic hepatitis B resistant to both lamivudine and adefovir or to lamivudine alone. Hepatology 2009;50:1064-1071.