



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

라미부딘 治療에 대한 24週 바이러스
反應이 없는 慢性 B形 肝炎患者에서
엔테카비어 轉換治療 後에 보인 治療效果
및 바이러스 變異에 대한 分析

The logo of Jeju National University is a large, faint watermark in the background. It features a stylized 'J' shape with blue, green, and purple waves. Inside the 'J' is a book icon and the text 'JEJU 1952'. The words 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY' and '1952' are written around the perimeter of the logo.

濟州大學校 大學院

醫學科

鄭 勝 旭

2011 年 2 月

엔라미카부딘
어치환에 대한
24週에 보인
이러스
反應이 없는
慢性B形
肝炎患者
에서

鄭勝旭

2011

라미부딘 치료에 대한 24주 바이러스
반응이 없는 만성 B형 간염환자에서
엔테카비어 전환치료 후에 보인
치료효과 및 바이러스 변이에 대한 분석

지도교수 송 병 철

정 승 욱

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2011 年 2 月

정승욱의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사 위원장 이 근 화 ①

부 위 원 장 송 병 철 ①

위 원 조 유 경 ①

제주대학교 대학원

2011 年 2 月

**Switch to Entecavir in Chronic Hepatitis B
Patients without Virological Response
over 24 weeks of Lamivudine Therapy is
Effective in Suppressing HBV Replication**

Seung Uk Jeong, M.D.
(supervised by professor Byung-Cheol Song)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Master in medicine
(Internal Medicine)

February, 2011

This thesis has been examined and approved.

Doctoral Committee:

Professor Keun-Hwa Lee Chairman

Professor Byung-Cheol Song Vice chairman

Professor Yoo-Kyung Cho

Department of Internal Medicine
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT	2
서 론	4
대상 및 방법	7
결 과	10
TABLES & FIGURE	15
고 찰	24
REFERENCE	29

ABSTRACT

Purposes : Many data reported that on-treatment response during nucleos(t)ide analogues (NAs) was a good indicator of long-term virological response (VR). Therefore, in patients without VR at 24 weeks of NA therapy with low genetic barriers, it has been recommended to add another drug or change to more potent antiviral agents. We were to clarify the role of switch therapy into more potent antiviral agents.

Materials and methods : We changed the lamivudine (LMV) to entecavir (ETV) (0.5 mg a day) in CHB patients without VR after using the LMV over 24 weeks. Twenty-three patients (including 2 patients receiving clevudine) were included (group A). As a control, we used the patients who received LMV maintenance therapy during same periods (group B, n=16). Genotypic change was analyzed using RFMP method in patients with switched therapy (n=16).

Results : There was no difference between two groups in age, gender, mean levels of HBV DNA (log, 4.1 vs. 4.3), HBeAg positivity (78.3% vs. 87.5%) and duration of lamivudine therapy (74 vs. 71 weeks) before the entry of the study. The cumulative rates of VR at 96 weeks (HBV DNA < 60 IU/mL) were 79% in group A and 29% in group B (p=0.004). Virological breakthrough (VBT) occurred in 2 patient (8.7%) in group A and 10 patients (62.5%) in group B (p <0.001). All patients with VBT except a patient harbored only LMV-related resistant mutant. Seven of 16 patients with RFMP analysis showed LMV-related mutants (mixed or dominant) before switch therapy. Nine of 16 patients without LMV-related mutants before

switched therapy, 7 patients showed progressive selection of LMV-related mutants regardless of VR and in 2 patients, genetic change could not be evaluated because of PCR negative just after ETV switch.

Conclusion: Our data suggested that switch to more potent antiviral agents, ETV, might be effective for the patients without VR over 24 weeks of NA therapy with low genetic barriers. However, long-term effect of ETV should be evaluated because gradual selection of LMV-related mutants was common in most patients.



Keywords : Virologic response, Entecavir, Genetic change

서 론

만성 B형 바이러스 감염은 중요한 보건문제로서 전 세계 인구 중 3억 5천만 명이상이 감염되어 있다¹⁾. 만성 B형 간염 환자들에서 간경화, 비대상성 간질환, 간암 등의 합병증 발생이 더욱 증가하며, 일생 동안 전체 환자의 약 15-40%가 만성 B형 간염에 의한 심각한 후유증을 가지게 되고 20% 정도는 간질환 합병증으로 사망하게 된다²⁻⁴⁾.

B형 간염 바이러스의 지속적인 증식은 간질환의 발생 및 진행과 밀접한 관계가 있다. 따라서 만성 B형 간염의 치료 목표는 장기적 혹은 영구적으로 바이러스의 증식을 억제하고 혈청 알라닌아미노전이효소(ALT, alanine aminotransferase)를 정상으로 유지시켜 간경변증 및 간세포암 등과 같은 합병증 발생을 억제하며 이를 통한 사망률 감소 및 생활의 질을 향상시키는 것이라고 하겠다⁵⁻⁷⁾.

만성 B형 간염에 대한 치료에는 주사제인 인터페론 알파(interferon α)와 경구용 제제인 뉴클레오사(타)이드 유도체(nucleoc(t)ide analogues)들이 사용되고 있다. 인터페론 알파는 지난 수십 년 동안 만성 B형 간염 치료제로 사용되어 온 약제로, 바이러스 억제 효과 및 면역조절작용이 있어 생화학적 소견 및 조직소견의 호전을 기대할 수 있으며 치료 이후 내성이 발생하지 않는 장점을 가지고 있다⁸⁾. 하지만 수개월에 걸쳐 피하주사를 해야 한다는 불편감과 주사 이후 발열, 오한, 전신무력감 등의 초기 부작용 및 장기적으로 사용했을 때 우울, 불안, 골수기능 감소, 자가면역질환 등의 여러 가지 부작용이 나타날 수 있다는 단점이 있다. HBeAg 양성 환자에서 16-24주 치료를 시행하였을 때 인터페론 알파의 치료 효과는 ALT의 정상화 19-23%, HBeAg 혈청소실률 33% 및 HBsAg 혈청소실률 5-10%, 혈청 HBV DNA가 음전될 확률 37%였다^{9,10)}. 인터페론의 불편감과 상대적으로 낮은 항바이러스 효과 때문에 뉴클레오사(타)이드 유도체인 경구용 항바이러스 제제를 많이 사용하게 되었다. 경구용 항바이러스 제제들은 바이러스 증식을 효과적으로 억제하고 부작용이 적으며 편하게 복용할 수 있어서 1차 치료제로 널리 사용되어

지고 있다. 경구용 항바이러스제 중 가장 먼저 사용되었던 약제는 2'-3' dideoxy-3'-thiacytidine의 (-)enantiomer인 라미부딘(lamivudine)이다. 라미부딘은 중등도의 항바이러스 역가를 가지는 약제로, 1년 치료 후 약 40%의 바이러스 증식 억제, 60%의 ALT 정상화 및 60%에서 조직학적인 호전소견을 보였다¹¹⁻¹³). 또한 장기적인 항바이러스 효과로 간질환의 진행 및 간세포암 발생을 의미 있게 억제하기 때문에 많은 환자에서 사용되어 왔다¹⁴). 하지만 라미부딘 단독으로 장기간 사용 시, 각각 1년 24%, 2년 38%, 3년 49% 및 4년 70%라는 매우 높은 내성 발생률을 보여주었다¹⁵⁻¹⁷). 라부딘에 의한 변이는 HBV DNA 중합효소의 YMDD motif (tyrosine-methionine-aspartate-aspartate)의 methionine이 valine 또는 isoleucine으로 바뀌는 rtM204V/I 변이가 가장 흔하게 나타난다¹⁸). 변이 바이러스는 치료기간이 길수록, 치료 전 혈청 HBV DNA가 높을수록 발현율이 높다¹⁸). 이에 비해 deoxy-guanosine nucleoside analogue인 엔테카비어는 더욱 강력한 항바이러스 효과를 가지는 선택적 HBV DNA 중합효소 억제제이다. 엔테카비어는 체내에서 활성화 형태로 전환되어 HBV DNA 중합효소의 시동(priming), 전유전체 (pregenomic) mRNA로부터 HBV DNA 음성 가닥의 역전사 및 HBV DNA 양성 가닥 합성의 세 단계를 억제하여 항바이러스 효과를 나타낸다^{19,20}). HBeAg 양성 환자에서 엔테카비어로 1년 치료 하였을 때 알라닌 아미노전이소효의 정상화는 68%, HBeAg 혈청소실률은 22%, 조직학적 호전 72% 및 혈청 HBV DNA가 음전될 확률은 67%로 라미부딘에 비해 우월한 치료 효과를 보인다²¹). 더하여 라미부딘보다 높은 유전자 장벽을 가져 내성 발생 빈도 또한 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 현재 주로 사용되는 항바이러스제 중 라미부딘, 클레부딘, 텔비부딘이 비슷한 정도의 중등도 항바이러스 역가를 보이고, 엔테카비어와 테노포비어가 더 강력한 항바이러스 역가를 지닌 약제로 분류된다.

항바이러스제를 시작하면 장기간 사용이 권고되고 있기 때문에^{12,13}), 오랜 기간 동안 내성변이의 발생 없이 효율적으로 바이러스 증식을 억제 할 수 있는지가 치료의 핵심이 되며, 이런 상황을 조기에 예측해 보는 것 또한 치료방침을 결정하는데 중요한 요소가 된다. 현재 사용되는 예측인자로 치료 중 바이러스 반응(HBV DNA < 60 IU/mL)을 이용하는데, 여러 연구를 통해 치료 시작 후 24주째에서의 바이러스 반응이 가장 좋은 예측인자로 생각되고 있으며 현재 여러

가이드라인에서 이를 채택하고 있다²²⁻²⁵). 이들 가이드라인에 따르면, 24주 바이러스 반응이 있으면 사용 중인 약제를 계속 유지해도 되지만, 24주 바이러스 반응이 없는 경우에는 사용 중인 약제보다 더 강력한 항바이러스 역가를 가진 약제로 전환하거나 교차 내성이 없는 약제를 추가할 것을 권고하고 있다. 임상진료 영역에서 이들 가이드라인에 따라 전환치료를 시행하고 있지만, 전환치료에 대한 효과를 확인해 본 연구는 많지 않다. 또한 전환 치료 과정 중 개개인에서 발생하는 바이러스 유전자형변이를 분석한 연구는 거의 시행되지 않았다.

따라서 우리는 중등도의 항바이러스 역가를 가진 라미부딘, 클레부딘 (clevudine)을 24주 이상 사용하고도 바이러스 반응을 보이지 않았던 환자들에서 더 강력한 약제인 엔테카비어로 전환하여 치료했을 때 어떤 임상적인 효과를 보이는지 확인하고자 하였다. 더하여 엔테카비어 전환군에서 바이러스 집단의 유전자형변화를 분석해 보고자 이번 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

본 연구는 후향적으로 시행된 환자-대조군 연구로서 만성 B형 간염 혹은 이에 의한 대상성 간경변(Child-Pugh class A)을 가진 20세 이상의 환자들 중에서 초치료로 라미부딘이나 클레부딘을 24주 이상 사용하였으나 바이러스 반응(HBV DNA < 60 IU/mL)을 보이지 않았던 39명을 대상으로 하였다. 모든 대상 환자들은 연구에 포함되기 이전에 2가지의 치료약제 및 각각 동일한 용량을 가지고 치료받고 있었다. 라미부딘으로 치료 받았던 경우는 100mg 1정을 하루 1회 복용하였고, 클레부딘의 경우는 30mg 1정을 하루 1회 복용하였다.

이번 연구에서 제외된 대상들의 특징은 다음과 같았다. 먼저, 혈청 HBV DNA치가 기저치의 100배 이상 감소하지 않은 1차 치료 실패(primary non-response) 환자들과 혈청 HBV DNA치가 정상화 되었다가 다시 10배 이상 상승하는 바이러스 돌파 현상(virologic breakthrough)을 보였던 환자들을 제외하였다. 또한 사람면역결핍바이러스 (HIV, human immunodeficiency virus) 감염자, C형 간염바이러스(HCV) 혹은 D형 간염바이러스(HDV)에 동시에 감염된 환자는 제외되었고, 간이식을 받았거나 인터페론 알파 면역치료 혹은 항암치료를 받았던 환자도 제외되었다. 조절되지 않는 복수, 최근에 발생한 식도정맥류 출혈, 혈청 빌리루빈 ≥ 2.0 mg/dl, 혈청 알부민 ≤ 3.0 mg/dl 혹은 간성혼수 등의 비대상성 간경변(Child-Pugh class B or C)의 증거가 있거나 간세포암 혹은 말기 신질환을 가진 환자들도 제외되었다.

2. 방법

전체 연구 대상자에서 만성 B형 간염 및 다른 동반질환 등에 대한 병력 청취를 시행하였다. 혈청 알부민, 총빌리루빈, HBeAg, anti-HBe, HBV DNA 및 혈청 ALT에 대한 혈액검사 또한 시행되었다.

전체 39명의 환자는 라미부딘(n=37) 혹은 클레부딘(n=2) 치료를 24주 이상

시행하였으나 바이러스 반응(HBV DNA < 60 IU/mL)을 보이지 못한 환자들이었다. 전체 환자들을 기존의 약제를 중단하고 엔테카비어 치료로 전환한 환자군(n=23)과 지속적으로 라미부딘을 사용한 대조군(n=16) 2군으로 분류하였다. 클레부딘으로 치료받은 2명의 환자는 엔테카비어로 전환한 군에 포함되었다. 엔테카비어 전환군은 기존의 라미부딘이나 클레부딘을 중단하고 엔테카비어 0.5mg을 하루 1회씩 복용하였고, 대조군 환자들은 기존의 초치료와 동일하게 라미부딘 100mg을 하루 한번 투약 받았다. 엔테카비어 전환군은 약제 변경 후 96주까지 추적 관찰하였고, 라미부딘을 계속 사용한 대조군 또한 연구에 포함된 이후부터 96주까지 관찰하였다. 연구를 시작한 이후 2년 동안 두군 모두에서 6개월마다 혹은 필요에 의해 그보다 더 자주 추적 검사를 시행하였다. 추적 검사에는 임상증상의 변화, 혈청 ALT 등을 포함한 생화학적인 검사 및 HBV DNA, HBeAg, anti-HBe 등의 바이러스 검사가 포함되었다.

임상적인 치료효과를 분석한 이후, 엔테카비어로 전환한 환자 개개인에서 유전자형변이를 확인하기 위해 제한효소분절량다형성(RFMP, restriction fragment mass polymorphism) 분석을 시행하였다. 기존에 주로 사용되었던 내성 바이러스에 대한 분석방법으로는 제한효소분절길이다형성(RFLP), 염기서열분석 및 hybridization (LiPA) 방법이 있다²⁶⁻²⁸. 하지만 야생종과 변이종 혼합감염의 진단 및 새로운 변이의 동정이 어렵고, 고가의 검사 방법이라는 이유로 사용이 제한이 많았다. 최근에는 HBV 내성 바이러스에 대한 새로운 분석 방법으로 말디토프 질량분석 기술(MALDI-TOF MS, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry)을 이용한 제한효소분절량다형성(RFMP, restriction fragment mass polymorphism) 분석법이 사용되고 있다²⁹. RFMP법은 변이를 알고자 하는 DNA의 특정부위를 제한효소로 자를 수 있도록 제한효소 인식부위가 포함된 시발체(primer)를 설계하여 증폭한 다음 해당 제한효소로 처리된 DNA 단편의 분자량을 말디토프 질량분석 기술로 측정함으로써 돌연변이를 알아내는 방법이다. 말디토프 질량분석 기술을 이용한 DNA 단편의 분석은 변이가 있는 부위의 염기서열의 차이를 각 염기의 질량 차이를 이용하여 검출하는 방법으로, 빠르고 정확하며, 상대적인 정량이 가능하고, 대량으로 시행할 수 있어서 여러 생물학적 분석에 다양하게 이용되고 있다. RFMP법은 이러한 장점에 제한효소

절단기법을 추가적으로 도입하여 원하는 부위의 여러 뉴클레오타이드의 변이를 검출할 수 있는 장점이 있다. 국내에서 시행된 연구에서 야생종과 변이종 바이러스가 공존할 때의 두 가지를 식별할 수 있는 능력을 확인하였고, 야생종 중에 변이형의 비율이 0.1% 미만일 때, 그리고 혈청 1mL 당 HBV DNA가 100 copies까지도 유의하게 변이 바이러스를 검출할 수 있다고 보고 하였다³⁰⁾.

본 연구에서의 RFMP 분석은 치료 전 획득한 검체와 치료 후 추적 관찰 기간 동안 얻어진 혈액 검체를 이용하였다. 하지만 전체 23명의 엔테카비어 치료군 중 혈액 검체를 얻을 수 없었던 7명의 환자들에서는 RFMP를 시행하지 못하였다. 나머지 16명의 환자에서 엔테카비어 전환 직전의 검체와 전환 치료후 시행된 추적검사에서 얻어진 혈액 검체를 가지고 바이러스 유전자형을 분석하였다. 치료 결과상 HBV DNA에 대한 중합효소 연쇄 반응(PCR, polymerase chain reaction) 음성인 환자들(n=10)은 치료전환 직전과 변경 후 12주째 결과만으로 분석을 종료하였으나, HBV DNA PCR 양성인 환자들은 DNA 양상을 보이는 동안에 채취한 마지막 검체를 가지고 분석을 하였고 바이러스 돌발현상이 발생하였을 때에도 추가로 바이러스 유전자형을 분석하였다.

HBsAg, anti-HBs, HBeAg 및 anti-HBe는 3세대 미량 효소 입자 면역 측정법(MEIA, microparticle enzyme immunoassay)을 이용한 제품(Abbott, North Chicago, Ill., USA)을 가지고 검사하였고, 혈중 HBV DNA치는 60 IU/ml까지 검출할 수 있는 Cobas Amplicor HBV Monitor kits (Roche Molecular Systems, Pleasanton, Calif., USA)로 측정하였다.

바이러스 반응(virologic response)이란 치료하는 동안 HBV DNA가 혈청에서 검출이 되지 않을 경우(HBV DNA < 60 IU/mL)로 정의하였고, 항바이러스 제제를 최소 24주 이상 사용하였으나 혈청 HBV DNA치가 기저치의 100배 이상 감소하지 않은 경우를 1차 치료 실패(primary non-response)라고 정의하였다. 항바이러스 제제에 대한 순응도가 좋은 환자가 항바이러스 치료로 HBV DNA가 음전되거나 기저치까지 떨어진 이후에 최소 1개월 이상 간격으로 2차례 이상의 검사에서 다시 10배 이상 상승하는 경우를 바이러스 돌파 현상(virologic breakthrough)라고 정의하였다⁶⁾.

모든 혈액 검사는 환자들의 서면 동의서에 따라 실시하였고, 연구계획서는

제주대학교병원의 윤리위원회의 승인을 얻어 통과되었다.

3. 통계

자료의 통계 분석은 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였으며 평균±표준편차 혹은 빈도로 제시하였다. 각 그룹간의 평균과 빈도는 Student's t-test와 χ^2 test 혹은 Fisher's exact test를 사용하여 비교하였다. 다변량 분석은 로지스틱 회귀분석을 이용하였다. P값은 < 0.05 일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.



결 과

1. 대상군의 임상적 특징

전체 39명의 환자를 엔테카비어 전환군(n=23)과 라미부딘을 유지한 대조군(n=16)으로 구분하여 분석하였다(Table 1). 환자군의 나이는 평균 40세 정도였고 두 군 모두에서 여성보다 남성의 비율이 높았다. 혈청 ALT는 정상 상한치 40 IU/mL와 비슷한 정도의 값을 보여주었다. HBV DNA는 10,000 IU/mL 정도로 높지 않은 경향을 보였으며, 두 군 모두에서 HBeAg 양성 환자가 음성 환자보다 약 4배정도 많은 분포를 보였다. 또한 두 군 모두에서 라미부딘 초치료를 약 70주정도 지속하였던 것으로 나타났다. 연구 시작 당시의 나이, 성별 및 HBeAg 양성 환자 비율은 엔테카비어 전환군(n=23)과 라미부딘 유지군에서 차이가 없었다. 또한 혈청 HBV DNA 기저치(log, 4.1 ± 1.4 vs. 4.3 ± 1.2 IU/ml, $p=0.5$)와 연구 시작 전 초치료 약제를 사용한 기간(73.8 ± 46.8 vs. 70.6 ± 28.9 weeks, $p=0.8$)도 역시 두 군간에 차이가 없었다.

2. 두 군간의 치료 효과 비교

엔테카비어 전환군(n=23) 및 라미부딘 유지군(n=16)에서의 평균 치료 기간은 각각 58.0주와 70.8주로 약 10주 정도의 차이가 있었지만 통계학적 의의는 없는 것으로 나타났다($p=0.23$).

바이러스 억제에 대한 치료효과를 판정하기 위해 치료 시작 후 24주, 48주 및 96주에서의 바이러스 반응(HBV DNA < 60 IU/mL)의 누적 비율을 비교하였다 (Figure 1).

24주째 바이러스 반응을 보인 환자의 비율은 엔테카비어 전환군 52%, 라미부딘 유지군 15%로 전환군에서 높은 치료 반응 결과를 보여주었다. 48주 및 96주째 바이러스 반응에 대한 누적 비율 또한 전환군에서 각각 71%, 79% 였고 유지군에서 15%, 29%로 엔테카비어 전환군에서 모두 높게 나타났다.

치료반응을 보는 다른 지표인 바이러스 돌과현상의 발생률을 비교해 보면,

전환군에서 2명(8.7%), 유지군에서 10명(62.5%)로 엔테카비어 전환군에서 현저히 낮게 나타났다(Figure 2). 전환군에서 바이러스 돌파현상을 보인 2명의 환자 모두 엔테카비어 치료를 지속하였고, 그 중 1명은 돌파현상 발생 24주 후에 다시 HBV DNA가 음전(< 60 IU/ml) 되었다. 이들 2명 모두 엔테카비어 내성은 없었으나 1명에서는 라미부딘 내성변이종이 없었고, 나머지 1명에서는 라미부딘에 대한 내성 변이인 rtM204I 변이가 존재하였다. 내성변이가 있는 환자에서는 야생종과 rtM204I 변이 바이러스가 공존하고 있었고, 야생종이 2배정도 더 많은 비율로 존재하였다. 엔테카비어 전환군과는 다르게 라미부딘 유지군에서 바이러스 돌파현상을 보인 10명의 환자 중 9명에서 라미부딘 연관 내성변이가 관찰되었다.

바이러스 반응에 영향을 미칠 것으로 생각되는 변수들인 혈청 HBV DNA 기저치, 치료방법(엔테카비어 전환 vs. 라미부딘 유지), 라미부딘 사용기간 등을 변수로 포함하여 다변량 분석을 시행하였다(Table 2). 여러 변수 중 엔테카비어로 전환하는 치료방법이 라미부딘을 지속하는 방법보다 훨씬 높은 확률로 바이러스 반응을 유도하는 것으로 나타났다(OR=11.7, p=0.001). 또한 치료 전 혈청 HBV DNA 기저치가 높을수록 바이러스 반응률이 낮아지는 것으로 분석되었다(OR=0.4, p=0.001). 하지만 엔테카비어 치료 전 라미부딘으로만 치료했던 기간의 정도는 바이러스 반응에 영향을 주지 못하였다.

3. 바이러스 유전자형변이에 대한 RFMP 분석

엔테카비어 전환군 23명 중 분석 가능한 검체를 얻을 수 있었던 16명의 환자를 대상으로, 엔테카비어 치료 중에 유전자형변이가 어떤 형태로 일어나는지 알아보기 위해 RFMP 분석을 실시하였다. RFMP 분석검사는 HBV DNA PCR 음성일 때 바이러스 유전자를 검출할 수 있는 확률이 매우 낮아진다. 따라서 조기에 바이러스 반응을 보여 HBV DNA가 혈중에서 검출 되지 않는 환자 10명중 7명은 이미 알려진 것처럼 RFMP 분석이 불가능하였지만, 나머지 3명의 환자에서는 DNA PCR 음성임에도 불구하고 분석이 가능하였다.

분석된 결과를 살펴보면, 치료 전에 라미부딘 관련 변이인 rtM204I/V 변이를 가지고 있는 환자는 모두 7명(43.8%)으로 이중 5명(31.2%)은 rt204 변이만을

가지고 있었으나 나머지 2명(12.5%)은 rtM204I 및 rtA181T가 혼재된 형태를 보여주었다. 또한 치료 전 내성변이를 가지고 있었던 환자들 7명중 6명이 야생종과 변이바이러스가 섞여 있었고, 6명 중 3명은 야생종이 우세하였고 3명은 내성변이가 우세하게 나타났다. 나머지 1명은 야생종 없이 내성 바이러스만을 가지고 있었다. 치료 후에는 야생종과 변이 바이러스가 섞여있는 환자들 6명에서 7명으로 증가하였고, 이들 중 야생종 우세환자는 2명, 내성바이러스가 우세한 환자가 5명이었다. 내성바이러스만 가지고 있는 환자도 2명으로 증가한 것으로 나타났다.

또한 치료 전에 야생종만 있었던 환자가 9명(56.2%)이었는데 치료 후에 7명에서 내성변이가 발생하였고 나머지 두 명은 HBV DNA PCR 음성으로 야생종 및 내성 바이러스 모두 검출되지 않았다. 더하여 라미부딘 내성바이러스 없이 야생종만을 가지고 있던 9명의 환자들 중 총 7명에서 바이러스 반응과 관련 없이 rt204변이가 점진적으로 선택되었다.

각각의 환자들에서 유전자형변이를 자세히 살펴보았다.

먼저 환자1의 경우 엔테카비어 변경전 야생종과 rtM204I 변이종이 2 : 1의 비율로 존재하였는데 엔테카비어 전환 후 HBV DNA PCR 음성을 보이면서 모든 바이러스가 검출되지 않았다. 환자2의 경우 또한 치료 전 야생종과 rtM204I변이 및 rtA181T변이가 혼재되어 있었으나 치료 3개월 때 HBV DNA PCR 음성이 되면서 모든 바이러스가 검출 되지 않았다(figure 4).

환자3은 엔테카비어 변경전 내성바이러스 없이 야생종만이 존재하다가 치료 12주째 HBV DNA PCR 음성을 보임에도 불구하고 rtM204I 변이와 rtA181T변이가 발생하는 결과를 보여주었다. 따라서 12주째 야생종의 우세 속에 rtM204I 변이와 rtA181T, 총 3종류의 바이러스가 혼재되어 있었다. 환자4의 경우도 전환치료 전 야생종 바이러스만 존재하다가 전환 치료 후 12주째 HBV DNA PCR 음성을 보임에도 불구하고, rtM204V변이가 증가하여 야생종과 같은 비율로 혼재되어 존재하다가 이후 HBV DNA PCR 음성이 되면서 바이러스가 검출되지 않는 경과를 보여준다(figure 5).

환자5는 엔테카비어 전환에도 불구하고 HBV DNA PCR 양성 결과를 보여주는 환자로, 전환전에 야생종만 존재하다가 치료가 진행될수록 rtM204I, rtM204V 및 rtA181T변이도 증가되는 양상을 보였다. 이 환자에 치료가 지속되는 동안

rtM204I/V변이를 가진 변이들이 야생종보다 우세하였고 rtA181T 변이를 가진 바이러스는 야생종에 비해 상대적으로 작은 부분을 차지하고 있었다. 환자6에서도 전환치료 후에도 HBV DNA PCR 양성을 보이는 환자로 치료반응이 좋지 못할 때도 야생종만 존재하다가 치료 기간이 증가할수록 야생종, rtM204I 및 rtM204V 변이종들이 동일한 비율로 혼재되는 양상을 보인다. 환자7의 경우에서도 엔테카비어 치료 후 바이러스 반응을 보였다가 약 24주 후 바이러스 돌파가 발생하였으나 치료를 지속한 결과 다시 HBV DNA PCR 음성 결과를 보이는 경우였다. 이 환자에서 바이러스 돌파가 발생했을 때에도 야생종 바이러스만이 존재하였으나, 두 번째 바이러스 반응을 보였을 때는 rtM204I, rtM204V 변이바이러스가 각각 같은 비율로 발생하여 야생종과 혼재 되었다. 하지만 각각의 변이바이러스 개체수보다 야생종 바이러스가 우세하게 존재하였고, 모든 바이러스들은 엔테카비어에 내성을 보이지 않았다(figure 6).

마지막으로, 환자8은 치료 전 야생종과 rtM204I 변이종이 혼재되어 있었던 환자로, 엔테카비어 전환 치료 후에 바이러스 반응을 전혀 보이지 못하였다. 이후 치료 과정에서 야생종과 rtM204I 변이종은 모두 사라지고 rtM204V만이 선택 되었다. 마지막에 선택된 rtM204V 변이 바이러스는 엔테카비어에 내성을 보이지 않았다(figure 7).

TABLES & FIGURE

Table 1. Baseline characteristics of the two groups divided according to switching therapy

	Switch to ETV	Maintain LMV	<i>P</i> -value
Number	23	16	
Age (years)	37.2 ± 11.5	39.6 ± 14.9	0.57
Gender (M/F)	18/5	11/5	0.5
HBeAg positive (%)	18 (78.3%)	14 (87.5%)	0.46
HBV DNA (log IU/ml)	4.1 ± 1.4	4.3 ± 1.2	0.5
ALT (IU/ml)	52.7 ± 43.5	35.1 ± 21.5	0.14
Duration of LMV (wks)	73.8 ± 46.8	70.6 ± 28.9	0.8

Continuous variables were expressed mean ± SD.

[†]ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; LMV, lamivudine.

Table 2. Multiple logistic regression analysis according to viral response

Independent variables	OR (95% CI)	<i>P</i> -value
Basal HBV DNA (IU/mL)	0.4 (0.28 – 0.69)	0.0001
Treatment		0.001
Maintained LMV	1	
Switched to ETV	11.7 (2.9 – 47.1)	
Duration of LMV	0.99 (0.98 – 1.1)	0.30

Viral response was taken as dependent variable.

*Treatment was categorical variable and others were continuous variables.

[†]CI, confidence interval; LMV, lamivudine; ETV, entecavir; OR, odds ratio.

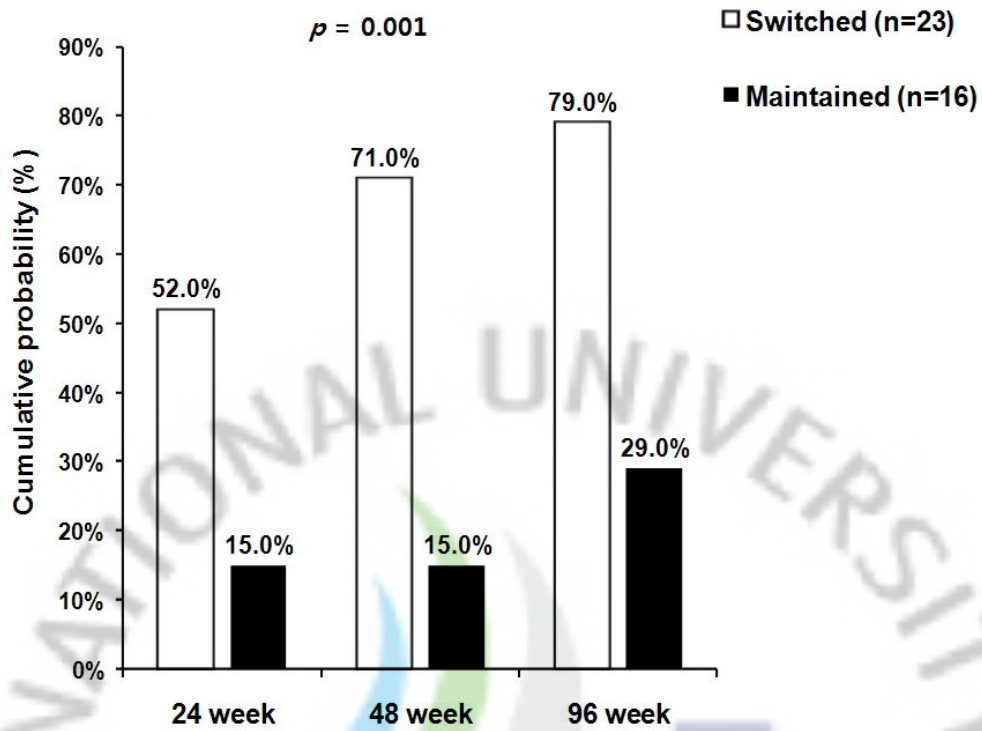


Figure 1. The cumulative probability of viral response according to duration of treatment.

* viral response was defined as HBV DNA < 60IU/ml.

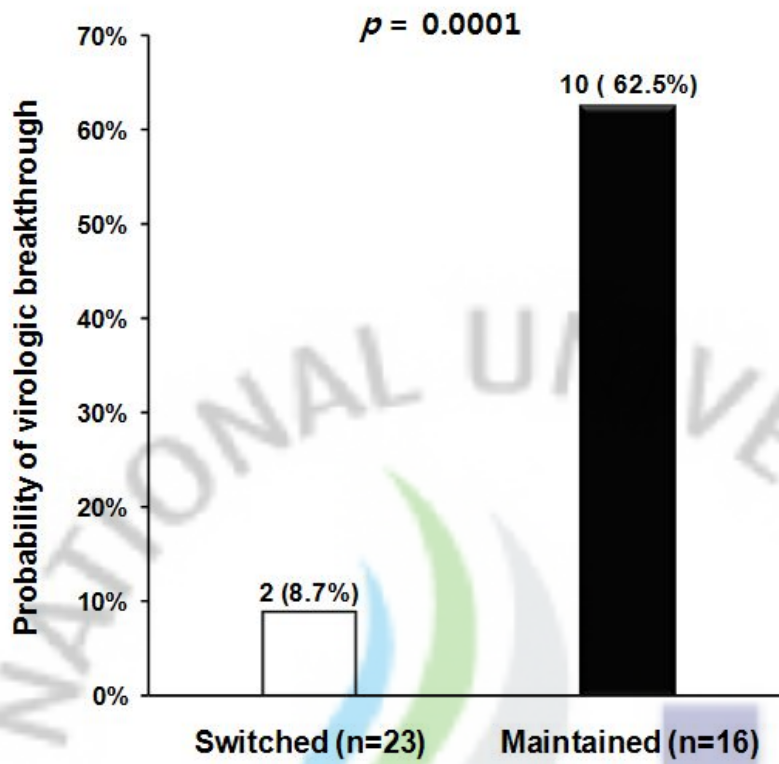


Figure 2. The probability of viral breakthrough during treatment.

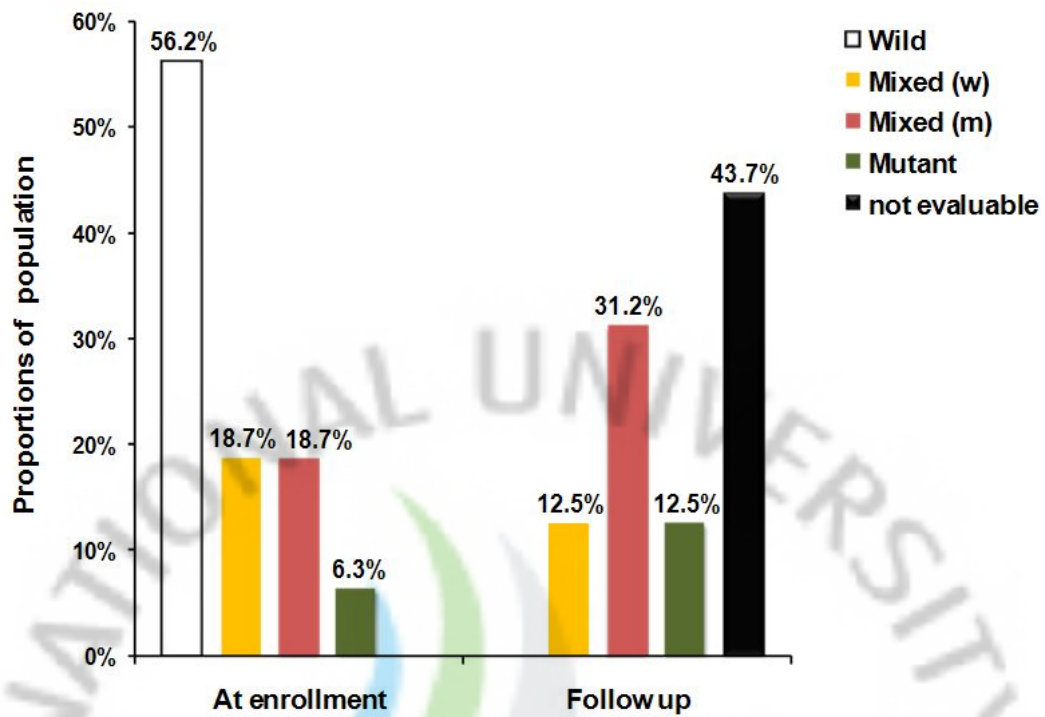


Figure 3. The viral dynamics in 16 patients with switching to entecavir therapy.

*Mixed(w) means that wild type viruses and mutants are mixed, but wild type viruses were dominant.

†Mixed(m) means that wild type viruses and mutants are mixed, but mutants were dominant.

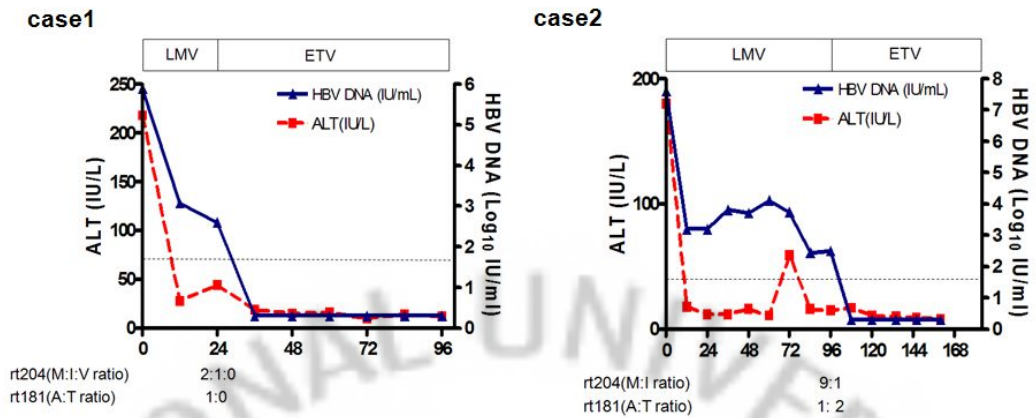
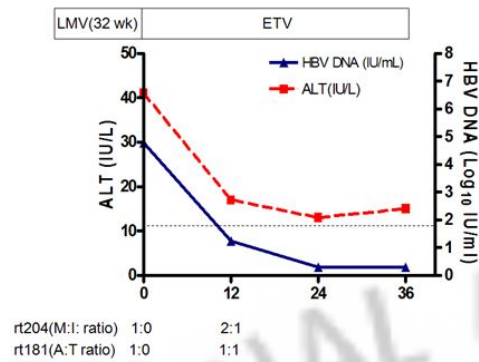


Figure 4. The viral dynamics in case 1 and 2 patients with switching to entecavir therapy.

*Boxes above the graphs mean duration of treatment.

†ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; LMV, lamivudine.

case3



case4

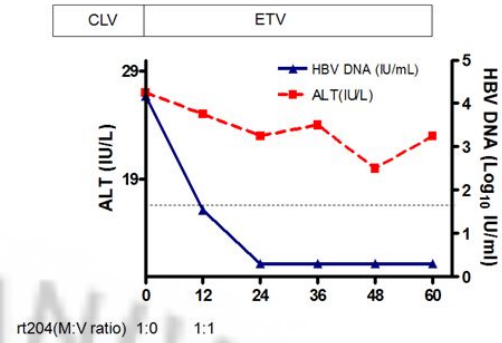


Figure 5. The viral dynamics in case 3 and 4 patients with switching to entecavir therapy.

*Boxes above the graphs mean duration of treatment.

†ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; LMV, lamivudine.

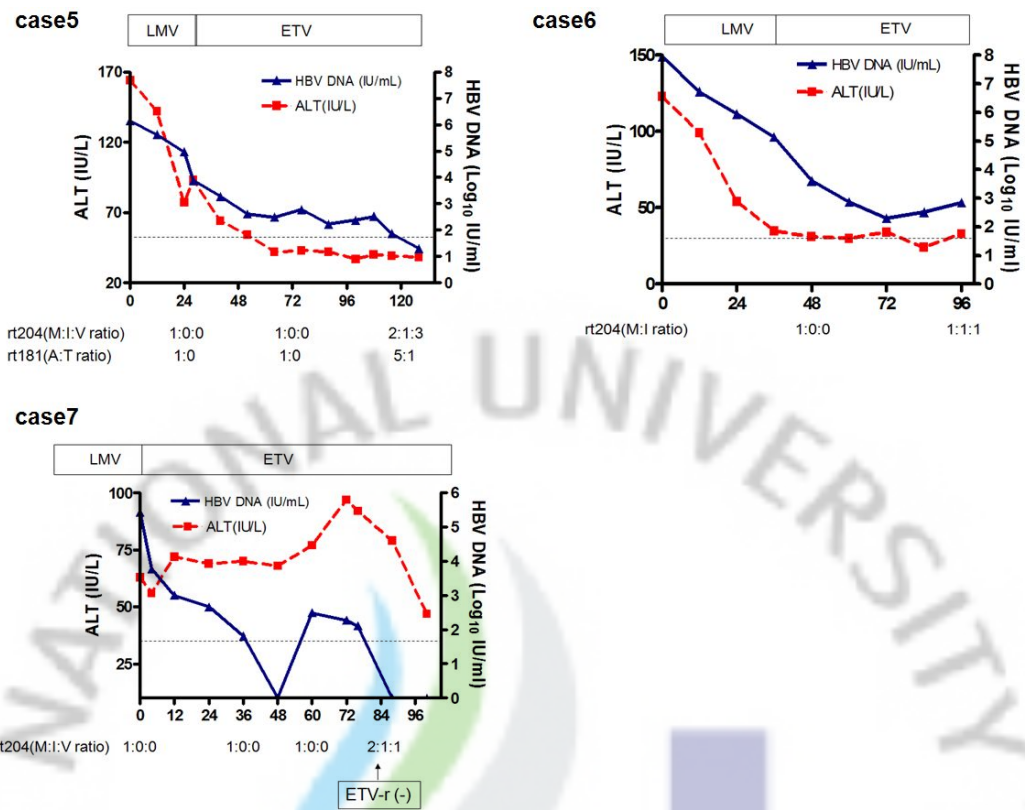


Figure 6. The viral dynamics in case 5, 6 and 7 patients with switching to entecavir therapy.

*Boxes above the graphs mean duration of treatment.

†ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; ETV-r, entecavir resistance; LMV, lamivudine.

case8

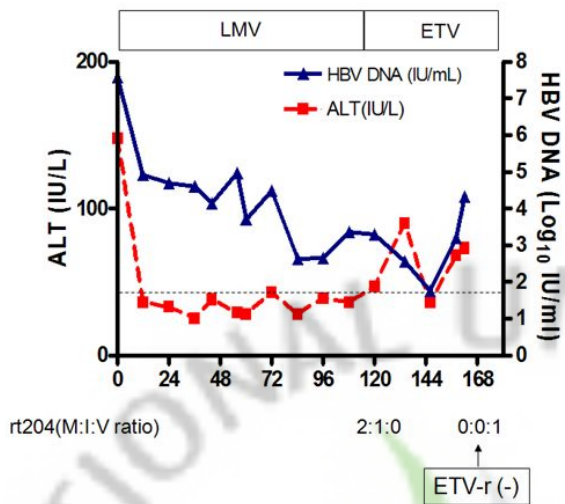


Figure 7. The viral dynamics in case 8 patient with switching to entecavir therapy.

*Boxes above the graphs mean duration of treatment

†ALT, alanine aminotransferase; ETV, entecavir; ETV-r, entecavir resistance; LMV, lamivudine.

고 찰

만성 B형 바이러스 감염 환자들에서 바이러스 증식을 지속적으로 억제하는 것이 항바이러스 치료의 성공여부와 장기적인 예후에 중요하다. 따라서 혈중 HBV DNA치를 낮게 유지시키는 것이 가장 보편적인 치료 목표로 여겨지고 있다^{3,31,32}. 경구용 항바이러스제로 치료하는 경우, 바이러스 증식의 지속적인 억제와 내성 바이러스 발생을 막기 위해 효과적인 약제를 적정기간 이상 사용하도록 권고되고 있다. 뉴클레오사(타)이드 제제를 치료 도중 중단 할 경우에, 만성 B형 감염의 재발 및 악화를 보이기 때문에 경구용 항바이러스제는 장기간 치료하는 것이 원칙이다^{12,13}. 하지만 경구용 항바이러스 제제를 장기간 사용하면 약제에 대한 내성 바이러스 발생이 증가 된다는 또 다른 문제에 직면하게 된다^{14,33}. 내성 바이러스가 문제가 되는 이유는, 치료 약제에 대한 감수성이 낮아져 치료 실패가 발생할 가능성이 높아지기 때문이다. 약제 내성 발생에는 숙주요인, 바이러스 요인, 치료 약제와 관련된 요인 등 여러 가지 인자가 작용을 하게 되지만, 특히 항바이러스 약제가 충분히 바이러스를 억제하지 못하는 경우에 흔하게 발생하는 것으로 알려져 있다³³. 따라서 치료 초기에 바이러스를 효과적으로 억제할 수 있는 강력한 항바이러스제를 선택하여야 하며 치료를 빨리 시작하여 조기에 바이러스 증식을 최대한 억제 시키는 것도 중요하다³⁴. 더하여 항바이러스 치료 중 적절한 모니터링을 통해 장기적인 치료 효과와 내성 바이러스 발생을 예측할 수 있어야 한다.

항바이러스 치료에 대한 치료 효과나 내성 발생을 예측하는 인자들에 대해 많은 연구가 있어왔다. 다양한 약제에 대한 연구가 시행되었고, 아데포비어처럼 항바이러스 효과가 늦게 나타나는 약제를 제외하고는 대부분 치료 24주 후의 혈중 HBV DNA와 내성 발생률간의 상관관계가 있음을 보여주었다^{18,22,35,36}. 즉, 24주 후에 바이러스 반응($HBV < 60$)을 보이는 경우, 장기간의 치료에도 바이러스 증식이 강력히 억제되고 내성 발생 빈도가 현저히 낮아진다는 것이 확인되었다. 치료 24주의 바이러스 반응이 향후 치료 결과 및 내성 발생에 대한 가장 좋은

예측인자로 생각되고 있다. 따라서 만성 B형 간염 치료 가이드라인들에서는 치료 24주째의 바이러스 반응을 보고 치료 효과를 예측하고 이를 바탕으로 향후 치료 방침을 재결정하는 것을 권고하고 있다.

라미부딘의 경우 매우 널리 사용 되는 약제이지만 장기간 사용시 급격한 내성변이의 발생이 문제가 되고 있다. 라미부딘 내성과 관련된 변이로는 rtM204I/V, rtA181T/V, rt80I/V, rt180M, rt173L 등 다양한 유전자형변이가 존재한다. 클레부딘의 경우, 내성변이에 대해서는 장기적인 추적연구가 많이 이루어지지 않는 편이다. HBeAg 양성 만성 간염 환자를 대상으로 한 연구에서 HBV 유전자 변이는 24주째까지 클레부딘 투여군 182명 중 5명에서 rtA181A/T, rtA181T, rtV191V/I변이가 관찰되었으나 바이러스 돌파현상은 없었다[37]. 반면, 엔테카비어에 대한 내성은 라미부딘 내성변이인 M204V/I 선택이 일어나 후 rtI168, rtT184, rtS202, rtM250의 추가변이가 일어나는 two-hit mechanism에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다[38]. 하지만 이러한 유전자형변이 중에서도 일부 조합만이 바이러스 돌파현상을 일으키는 것으로 보이며 실제로 라미부딘 내성변이인 rtM204V가 있으면서 추가로 내성변이가 일어났을 때에만 엔테카비어에 대한 감수성이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다[39]. 따라서 라미부딘 변이에 의한 내성 발생 및 치료 실패를 예방하기 위해 24주째에 바이러스 반응을 보고 바이러스 반응을 보이는 경우에는 라미부딘을 지속적으로 사용하고, 바이러스 반응이 없을 시에는 항바이러스 역가가 더 높은 엔테카비어나 테노포비어로 변경하는 것이 추천된다^{24,40)}.

현재까지 라미부딘 내성에 의한 치료 실패 시에 엔테카비어로 변경하여 치료한 임상 연구들은 많이 시행되었으나, 라미부딘 치료 후 24주에 바이러스반응이 없어 엔테카비어로 변경하고 그 치료 효과에 대해서 알아본 연구는 거의 없는 실정이다.

최근 일본에서 136명의 라미부딘 사용자를 대상으로 엔테카비어 전환치료에 대한 연구가 시행되었다⁴¹⁾. 대상은 라미부딘 치료에 대해 바이러스 반응을 보이지 않은 환자들로, 라미부딘 내성으로 치료 실패한 환자들은 제외되었다. 대상자들에게 라미부딘을 엔테카비어로 변경하여 2년 동안 치료한 결과 바이러스 증식이 효과적으로 억제되고 ALT도 정상화되었다. 엔테카비어 치료효과에 중요한 영향을 미치는 인자는 전환 당시의 혈중 DNA 기저치이고, DNA 기저치가 낮을수록

치료결과가 좋다고 발표하였다.

우리 연구 또한 일본에서 시행된 연구와 비슷하게 라미부딘 치료 후 24주에 바이러스반응이 없는 환자들을 대상으로 하여 라미부딘을 엔테카비어로 변경한 후 그 치료 효과를 알아보고자 한 연구이다. 하지만 임상적인 치료 효과를 확인한다는 점 이외에 각 환자에서의 바이러스 유전자형변이를 분석했다는 것이 큰 차이점이자 이번 연구의 가장 큰 장점이라고 하겠다.

이번 연구 결과를 보면, 24주 이상의 라미부딘 단독의 초치료를 시행한 환자들 중 엔테카비어 전환치료를 한 환자들을 유지한 대조군에 비해 24주, 48주, 96주째 바이러스 반응 비율이 의미 있게 높았다. 이것은 치료과정 전반에 걸쳐 전환군이 더 좋은 바이러스 반응을 보인다는 것을 의미한다. 따라서 이 결과를 통해서 볼 때 라미부딘을 24주 이상 사용하였음에도 불구하고 바이러스 반응이 없다면 강력한 항바이러스 효과를 보이는 엔테카비어로 전환하여 치료하는 것이 더욱 효과적인 치료라는 것을 확인 할 수 있었다.

항바이러스 치료의 효과를 판단하는 다른 인자인 바이러스 돌과 현상은 항바이러스 내성이 발생함을 시사하는 첫 번째 임상적인 지표로 알려져 있다⁴²⁾. 본 연구에서도 두 군에서의 치료 효과를 판정하기 위해 바이러스 돌과현상을 분석하였고, 엔테카비어 전환군에서 대조군에 비해 현저히 낮은 발생률을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 전환군에서 항바이러스 내성이 상대적으로 적게 발생한다는 것으로 해석이 되며, 내성 발생의 위험도가 낮기 때문에 더 효과적인 치료 결과를 보이는 것으로 해석할 수 있겠다. 물론 엔테카비어 전환군에서도 2명의 환자에서 바이러스 돌과현상이 있었으나 1명은 지속적인 치료 과정 중 다시 HBV DNA PCR 음성 소견을 보여 돌과현상이 해결되었다. 나머지 한 명의 환자는 돌과현상 후 바이러스 반응을 보이지 못하고 HBV DNA PCR 양성 소견이 지속되었으나, 이후 시행한 RFMP 분석에서 엔테카비어에 대한 내성을 획득하는 것은 아니라고 밝혀졌다.

치료 후 바이러스 반응에 영향을 주는 다양한 인자를 예측하는 것이 치료 방침을 결정하는데 유용한 정보를 줄 수 있다. 따라서 가능성 있는 인자들을 예측하기 위해 다변량 분석을 시행하였고, 그 결과 엔테카비어로 전환하여 치료하는 것이 바이러스 반응을 유도하는데 핵심이 되는 변수로 분석되었다. 또한 치료 전 HBV DNA

기저치가 높을 수록 바이러스 반응을 보이기 어렵다고 분석되었다. 따라서 라미부딘 치료에 대해 HBV DNA PCR 양성 소견을 보여 엔테카비어로 치료전환 하더라도, 치료 전 HBV DNA 기저치가 더 낮을수록 전환치료에 효과적일 수 있다는 것을 알 수 있었다.

이번 연구 이전에는 엔테카비어 전환 치료에 따른 바이러스 변이에 대한 연구는 거의 이루어 지지 않았다. 우리는 이번 연구에서 엔테카비어 전환 치료가 라미부딘 유지치료보다 임상적인 치료효과가 좋다는 것을 확인 하였고, 더하여 치료에 따른 바이러스의 유전자 변화를 분석하였다.

RFMP가 가능한 16명의 환자들 중 9명에서만 검사가 시행되었고, 특별한 경과를 보인 환자들 8명을 분석하였다. 우리가 제시한 8명의 환자를 구분해보면 크게 4가지 형태로 나누어진다. 환자 1과 2 같은 경우는 치료 전 야생종 바이러스와 라미부딘 내성 바이러스가 존재하다가 엔테카비어 치료 후 모든 바이러스 음전되는 경과를 보여주는 그룹이고, 환자 3과 4는 라미부딘 바이러스 없이 야생종만 존재하다가 치료에 대해 PCR 음성을 보이면서도 라미부딘 내성변이가 선택되어가는 그룹이다. 환자 5,6,7은 야생종만 존재하다가 엔테카비어 치료에 반응성이 떨어져 PCR 양성을 보이는 상황에서 라미부딘 내성 변이를 획득하였다. 8번 환자는 야생종, 라미부딘 내성 바이러스가 공존 하였고 치료에도 불구하고 PCR 양성을 보였는데, 이전에 존재하던 라미부딘 내성변이와는 다른 내성 변이가 획득되는 경우이다.

지금까지 결과를 보면 전환치료 이전의 내성변이 유무와 치료 후 바이러스 반응(HBV DNA <60 IU/ml)의 연관성은 없는 것으로 보이며, 치료 전 내성변이로 인해 추후에 내성 변이가 더 높은 빈도로 발생하는 것은 아니라고 생각된다. 즉, 전환치료 전 라미부딘 내성 바이러스의 존재가 바이러스 반응 유무 및 치료 중 내성 변이의 발생빈도와는 직접적인 관련이 없음을 알 수 있었다.

이번 연구에서 확인된 여러 가지 결과 중 가장 중요하다고 생각되는 것은 엔테카비어 전환치료 과정에서 바이러스 반응 유무에 관계없이 라미부딘 내성변이가 선택될 수 있다는 점이다. 엔테카비어 치료 후 HBV DNA PCR 음성일 때 라미부딘 바이러스가 존재하지 않을 것이라고 예상되었지만 실제로 엔테카비어 전환 치료에서도 내성바이러스가 선택되었다. 대규모 연구가 아니어서 어떤 변이가

우세하게 선택되는지 알 수 없었지만, 다양한 확률로 여러 가지 변이가 선택 되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 엔테카비어 치료 중에서도 라미부딘 내성을 획득하는 바이러스가 존재하며 추후 다른 내성변이도 계속 선택될 것으로 예상된다. 하지만 엔테카비어의 경우 특정 변이들이 조합 될 때 내성이 발생하는 것으로 알려져 있으며, 지금까지 연구들에서도 엔테카비어 내성은 1년에 0.2%, 3년째 1.2% 및 5년에 1.2% 정도로 매우 낮은 빈도로 발생한다고 보고하고 있다⁴³⁾. 따라서 변환 치료 중 여러 가지 라미부딘 내성변이가 선택된다고 하여, 엔테카비어에 대한 내성이 발생해 치료 실패까지 이어지는 것이 흔하지는 않은 것으로 예상된다. 우리연구에서도 96주 동안 엔테카비어 내성을 획득한 변이종은 나타나지 않았다. 하지만, 라미부딘 내성이 선택되면서 오랜 치료 이후에 엔테카비어 내성이 획득될 수 있다는 가능성을 배제할 수 없으리라 생각된다. 이번 연구를 통해 엔테카비어 내성이 발생하는 것을 확인할 수는 없었지만 바이러스 변이를 분석함으로써 임상적인 결과와 동시에 유전자 단계에서의 변화를 확인하였고, 전환치료에서도 엔테카비어 내성이 획득될 수 있다는 가능성을 제시한 것에 의의가 있다고 하겠다. 이번 연구가 후향적인 연구라는 점과 실험연구이기 때문에 대상 환자의 수가 적었다는 것이 한계점이라고 할 수 있다. 또한 모든 환자에서 필요한 혈액 샘플을 얻지 못했던 점도 한계점이라 할 수 있겠다.

결론적으로, 중등도의 항바이러스 역가를 가진 라미부딘을 장기간 사용하고도 바이러스 반응을 보이지 않는 환자들에서는 더 강력한 항바이러스 역가를 가진 엔테카비어로 전환하여 치료하는 것이 더 좋은 임상 경과를 보이는 것이 확인되었다. 또한 전환치료 시 HBV DNA 기저치가 낮을수록 좋은 반응을 보일 것이라 예측할 수 있다. 더하여 엔테카비어로 전환하여 장기간 사용시 바이러스 반응(HBV DNA < 60 IU/ml)과 관계없이 라미부딘 내성 변이가 발생하였다. 대부분의 환자들에서 라미부딘과 관련된 변이들이 점진적으로 선택 되어지는 것이 흔하게 나타나므로 엔테카비어 치료에 대한 장기적인 추적 관찰이 필요하다.

앞으로 다양한 연구를 통해 어떤 과정을 거쳐 바이러스 변이가 일어나며, 과연 이를 통한 엔테카비어 내성이 발생하는가를 확인 해야 하겠다. 또한 대규모 연구를 통해 장기간의 엔테카비어 치료시에 내성이 발생하는 메커니즘과 실제 임상적인 관련성 등을 밝혀나가야 할 것이다.

REFERENCES

- 1) **Lee, W.M.:** Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*, 1997.337(24):1733-45.
- 2) **Beasley, R.P.:** Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1988.61(10):1942-56.
- 3) **Lok, A.S. and B.J. McMahon:** Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2001.34(6):1225-41.
- 4) **Gane, E.J.:** The Roadmap concept: using early on-treatment virologic responses to optimize long-term outcomes for patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Int*, 2008.2(3):304-7.
- 5) **Liaw, Y.F., et al.:** Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: an update. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003.18(3):239-45.
- 6) **Lok, A.S. and B.J. McMahon:** Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2007.45(2):507-39.
- 7) **Kau, A., J. Vermehren, and C. Sarrazin:** Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *J Hepatol*, 2008.49(4):634-51.
- 8) **Lee, K.S. and D.J. Kim:** Management of Chronic Hepatitis B. *Korean J Hepatol*, 2007.13(4):447-88.
- 9) **Niederau, C., et al.:** Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 1996.334(22):1422-7.
- 10) **Wong, D.K., et al.:** Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 1993.119(4):312-23.
- 11) **Innaimo, S.F., et al.:** Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother*,

1997.41(7):1444-8.

12) **Dienstag, J.L., et al.:** Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med*, 1999.341(17):1256-63.

13) **Lai, C.L., et al.:** A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N Engl J Med*, 1998.339(2):61-8.

14) **Liaw, Y.F., et al.:** Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med*, 2004.351(15):1521-31.

15) **Lau, D.T., et al.:** Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine. *Hepatology*, 2000.32(41):828-34.

16) **Chang, T.T., et al.:** Four years of lamivudine treatment in Chinese patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004.19(11):1276-82.

17) **Liaw, Y.F., et al.:** Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology*, 2000.119(1):172-80.

18) **Yuen, M.F., et al.:** Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*, 2001.34(4Pt1):785-91.

19) **Levine, S., et al.:** Efficacies of entecavir against lamivudine-resistant hepatitis B virus replication and recombinant polymerases in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002.46(8):2525-32.

20) **Seifer, M., et al.:** In vitro inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998.42(12):3200-8.

21) **Chang, T.T., et al.:** A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2006.354(10):1001-10.

22) **Lai, C.L., et al.:** Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2007.357(25):2576-88.

23) **Sherman, M., et al.:** Entecavir therapy for lamivudine-refractory chronic hepatitis B: improved virologic, biochemical, and serology outcomes through

96weeks. *Hepatology*, 2008.48(1):99-108.

24) **Keeffe, E.B., et al.:** Report of an international workshop: Roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007.5(8):890-7.

25) **Holoman, J. and J. Glasa:** EASL clinical practice guidelines. *J Hepatol*, 2009.51(4):821-2.

26) **Allen, M.I., et al.:** Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology*, 1998.27(6):1670-7.

27) **Allen, M.I., et al.:** Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol*, 1999.37(10):3338-47.

28) **Aberle, S.W., et al.:** Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. *J Clin Microbiol*, 2001.39(5):1972-4.

29) **Kim NK, H.S., Hong SP, Rhee HS, Chung HJ, Kim S, et al.:** Novel mass spectrometric assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus during lamivudine therapy. *Korean J Genet*, 2003.25:13.

30) **Hong, S.P., et al.:** Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol*, 2004.40(5):837-44.

31) **Geier, A., C.G. Dietrich, and C. Gartung:** Antiviral therapy in HBe-Ag-positive hepatitis B with normal aminotransferase levels. *Hepatology*, 2003.37(3):p.712-3

32) **Liaw, Y.F., et al.:** Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int*, 2008.2(3):263-283.

33) **Yuen, M.F., et al.:** Hepatitis B virus DNA levels at week 4 of lamivudine treatment predict the 5-year ideal response. *Hepatology*,

2007.46(6):1695-703.

34) **Richman, D.D.:** The impact of drug resistance on the effectiveness of chemotherapy for chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2000.32(41):866-7.

35) **Hadziyannis, S.J., et al.:** Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for upto 5 years. *Gastroenterology*, 2006.131(6):1743-51.

36) **Sherman, M., et al.:** Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2006.130(7):2039-49.

37) **Yoo, B.C., et al.:** Twenty-four-week clevudine therapy showed potent and sustained antiviral activity in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2007.45(5):1172-8.

38) **Tenney, D.J., et al.:** Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004.48(9):3498-507.

39) **Yang, H., et al.:** Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistant HBV. *Antivir Ther*, 2005.10(5):625-33.

40) **Keeffe, E.B., et al.:** A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States: 2008 update. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008.6(12):1315-41.

41) **Suzuki, F., et al.:** Efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 25(5):892-8.1

42) **Lok, A.S., et al.:** Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology*, 2007.46(1):254-65.

43) **Tenney, D.J., et al.:** Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology*, 2009.49(5):1503-14.