

Lamivudine : 항바이러스 활성, 처방효과 및 효소법에 의한 생산

송방호

경북대학교 생물교육과

전 세계에 AIDS (후천성면역결핍증후군, acquired immune deficiency syndrome) 감염자는 1998년말 3340만 명에 이르러 (현재 4700만 이상이 감염되었다는 보고도 있음) 그 가운데 1,400만 명이 이미 희생자가 되었고 98년 한해에만 250만 이상의 새로운 감염자가 생겨나 여러 가지 질환 중 희생자가 네 번째로 많은 질병이 되었다. 환자의 95% 이상이 현재 개발도상국가에서 살고 있으며 희생자의 95%가 이들 국가에서 나타났다. United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)/WHO의 통계에 의하면 1998년의 경우 매 분당 11명의 감염자가 나타나 약 6백만에 가까운 것이며 그 가운데 약 10분의 1이 어린이 감염자로서 120만에 달하고 있다. 이들은 대부분 임신중이나, 출산시 또는 수유과정에 감염된 것으로 추산된다.

AIDS는 HIV (Human immunodeficiency virus)에 의해 야기되는 면역계의 질병으로 만성적 신경성질환을 수반하여 유발되며 그 본체가 RNA이기 때문에 역전사효소(RT, reverse transcriptase)가 HIV의 증식에 필수적인 것이어서 이 RT의 기능을 특이적으로 저해함으로써 HIV genome의 숙주염색체에의 통합을 억제하는 방법이 그 방어대책의 중심이 되어왔으나, 최근 protease 저해제, 백신 개발에 의한 면역 항체요법, 생체 내에서 HIV virus를 선택적으로 공격하는 미사일요법 등이 개발되고 있다. 본보에서는 세포독성은 적으나 RT저해에 탁월한 효과를 나타내는 HIV/AIDS의 주된 처방으로 사용되는 라미부딘 약제에 대한 약효, 또는 그 산업적 생산법의 새로운 전략 등을 고찰하여 보았다.

라미부딘[lamivudine, Eпивir, 3TC, (-)- β -L-(2R,5S)-1,3-oxathiolan-5yl- cytosine, 또는 (-)-2,3-dideoxy-3-thiacytidine]은 Canada Quebec의 Biochem. Pharma. of Laval에서 발견되어 1990년 Glaxo-Wellcome사에서 특허를 얻은 다이디옥시 뉴클레오시드계 유사체로서 대사과정에서 세포내 인산화 과정을 거쳐 lamivudine triphosphate를 생성할 것으로 예상되는 가장 강력한 항 HIV 또는 항HBV 제제이다(Perry and Faulds, 1997). Lamivudine triphosphate는 HIV의 복제를 역전사효소의 작용과정에서 경쟁적으로 저해할 것이고, 지도부딘(Zidovudine, Retrovir, ZDV, AZT)과 혼용시 zidovudine의 내성을 지연시키던가 지

도부딘의 처방환자에 대한 감수성을 회복시키는 역할을 나타낸다.

항바이러스성 병용효과에서 HIV 감염 후 1차 치료에서는 일반적으로 monotherapy를 쓰기도 하나, 대개는 라미부딘과 지도부딘의 복합병용이 더 효과적으로 나타나며 현재는 거의 대부분의 환자에서 세 가지 혹은 그 이상의 약제를 혼용하는 경우가 많다. 특히 lamivudine을 개발한 영국의 Glaxo-Wellcome회사에서는 Eпивir(150mg, lamivudine), Retrovir(300mg, zidovudine)에 Ziagen(300mg, abacavir sulfate)을 추가한 Trizivir를 새로 개발하여 하나의 tablet내에 이들 세 가지 약제가 동시에 함유되게 하여 1일 2회 식사나 물의 제한 없이 투약이 아주 용이하도록 한 것이다(Press release 17, Dec. 1999). Eпивir와 Retrovir를 혼합하여 Combivir로 이미 생산한 바 있는 Glaxo-Wellcome회사는 본 Trizivir가 Combivir에 protease 저해제를 혼합한 triple 약제에 버금가거나 그 이상의 효과가 있음을 확인하였다. 특히 이미 zidovudine으로 치료한 경험환자에서는 lamivudine을 추가 병용 처방할 경우에 약 54%의 치료효과가 있었고 이들 복합제에 단백분해효소저해제 indinavir, saquinavir 등을 동시 혼용할 경우에는 그 약효가 더욱 증가하였다. 이 경우 44주간의 치료에 의하여 83%의 환자에서 HIV/RNA 레벨을 500 copies/ml로 하강시켰다. 라미부딘은 단용 혹은 병용요법에서 CD4 세포 수를 100 cells/ul이하로 떨어뜨리나 대부분 소화기장애를 일으킨다. 병이 상당히 진행된 환자에게는 그 약효가 현저히 떨어져 CD4 세포수가 100 cells/ul이하로는 떨어지지 않고 유지된다. Pancreatitis도 어린이 환자에게 보고되고 있다. 따라서 라미부딘은 단용보다는 zidovudine 또는 protease inhibitor인 indinavir, saquinavir등과 혼용할 경우 그 약효가 더 효과적으로 나타나는 것을 알 수 있다.

Multiple drug으로 복합 처방시 안전성의 결핍이나 long-term toxicity를 나타내게 된다. 연명효과나 기회감염의 빈도를 낮추는 강력한 항 retroviral 요법에서 약제의 독성을 낮추는 것은 치료의 주안점이 되고 있다. 이들 독성에는 mitochondrial toxicities와 lipoatrophy, bone mineral 변화에 의한 골다공증이 야기되기도 한다(Powderly, 2000). Mitochondria는 자신의 DNA를 함유하고 있는데 이는 histone 단백질이 함유되어 있지 않고, 효과적인 repair 기구가 없기 때문에 nRTI(nucleoside reverse transcriptase inhibitor) 관련독성에 가장 감수성을 나타낸다. 왜냐하면 이는 mitochondria DNA를 비가역적으로 감소시키던가, 변이된 미토콘드리아 DNA를 만들기 때문에 산화적 인산화능을 약화시키고 따라서 ATP나 에너지 생산성의 감소에 따른 세포결손을 야기한다. 왜 여러 종류의 약제가 여러 가지 다른 조직에서 그 독성에 차이를 내는가는 아직 확실히 알려져 있지 않으나, nRTI나

뉴클레오티드 유도체의 수송이나 대사가 조직에 따라 다르며 약제의 함유량이나 활성화 효소의 종류가 다르기 때문일 것이다. 더욱이 mitochondria는 조직에 따라 그 기능이나, 자신의 상해가 각 숙주세포에 미치는 영향이 현저하게 다르게 나타나는 이유는 아직 입증되지 않았다. 따라서 nRTI의 세포독성은 mitochondrial독성만으로 설명될 것인가에 대하여도 아직 의문으로 남아 있다(Brinkman et al., 1999).

Lactic acidosis는(Carr et al., 2000) lactate level 이 2 mmol/l이상 떨어지는 질병으로 젖산의 량이 5 mmol/l이상이면 기관의 기능저하나 mortality가 80% 이상으로 나타난다. 이 경우 산화적 인산화나 mitochondrial toxicity에 의한 젖산생성의 증가는 에너지 생산이 가장 왕성한 간세포에 치명적인 영향을 가져올 수 있다. 이는 lactic acidemia, peripheral wasting, abdominal distention, 간기능저하, 체중감소, 만성피로, 구역질, abdominal pain등을 수반할 수 있다. 또 Tabas와 공동연구자들은(2000) 최근 bone demineralization에 대한 영향을 조사한 바 골다공증과 같은 현상을 초래한 경우도 있음을 보고하였다. 특히 bone demineralization과 fat redistribution은 직접 연관되지 않음도 알게 되었다.

본 연구에서는 Lamivudine의 생산에 화학적인 합성대신에 미국의 옐로우스톤 국립공원의 약알카리성 온천에서 분리된 내열성균 *B. caldolyticus* DSM405 (생육 최적온도 75°C) 유래의 시티딘 디아미나제를 코딩하는 유전자를 클로닝하여 재조합된 대장균(*E. coli* JF611/pCJH53)으로부터 그 효소를 분리, 정제하여 응용함으로써 그 생산비를 절감시키고자 하였다.

현재까지 세포독성이 거의 없으면서 에이즈 바이러스와 B형 간염 바이러스의 증식에 강한 억제활성을 가진 라미부딘은 D-만노오스 와 D-갈락토오스를 이용한 중간산물, 6-thioanhydro-D-mannose와 -D-galactose를 화학 합성하는 공정으로부터 생산하였다. D-만노오스를 시발물질로 하는 공정은 자체의 단가가 비싸고 합성단계가 너무 길며 그 중간물질을 silica겔 크로마토그래피로 정제해야 하는 단점이 있어 대량합성에는 어려움이 따랐으나 D-갈락토오스를 이용한 합성단계는 D-만노오스로 시작하는 것보다 훨씬 용이하였으며 공정단계가 줄어드는 장점이 있었다(Jeong et al., 1992). 산업적으로는 손쉽게 이용되는 L-글루코오스로부터 다른 합성보다 더 짧은 화학합성공정을 거쳐 (+),(-)형태의 이성질체를 생산하고 있다(Jeong et al., 1993). 이렇게 화학 합성된 (+),(-)형 이성질체 가운데 (-)형은 세포독성이 약하고 강한 항HIV 및 항HBV(B형 간염 바이러스) 활성을 나타내었다.

정제된 효소를 이용하여 이들 혼합체로부터 독성이 강한 (+)형의 이성질체를 제거하고 (-)형만을 분리하기 위하여 Glaxo-Wellcome사에서 대장균의 시티딘 디아미나제를 응용한 예(Machmoudian et al., 1993)가 있으나 본 연구에서는 정제과정에서 생산원가를 현저히 절감시킬 수 있는 극한 내열성 시티딘 디아미나제 효소를 응용하고자 *B. caldolyticus* DSM405의 시티딘 디아미나제 코딩유전자를 클로닝하여 효소를 증폭생산 후 라미부딘 생산에 적용하였다.

내열성 *cdd* 유전자로 형질전환된 *E. coli*JF611/pCJH53을 시티딘(40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 암피실린(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 등이 첨가된 AB 최소배지에서 배양 후 (37°C) 대수증식기의 세포를 회수, 초음파 파쇄한 원심상등액을 65°C에서 15분간 열처리하여 시티딘 디아미나제를 조정제한 후 DEAE Sepharose와 Sephacryl S-200 액체 크로마토그래피를 통하여 정제하였다(Woo et al., 2000). 정제된 효소를 화학 합성된 (+),(-)-라세믹 혼합체에 65°C에서 30분간 처리한 결과 (+)형의 68.6%가 탈아미노화 되었으며, 열처리만으로 조정제한 효소 처리시에도 63.1%가 탈아미노화 되어 (-)형 lamivudine과 쉽게 분리할 수 있었으며 산업적으로 kg 단위까지 생산할 수 있었다. 이 방법은 화학 합성법에 비해 lamivudine의 생산가를 훨씬 더 낮출 수 있는 생산법으로 간주되었다.

이상 라미부딘의 항 HIV 활성, 부작용, 처방법, 생산가 절감을 위한 극한 내열성 효소의 응용 등에 대하여 고찰하여 보았다.

참고문헌:

- Brinkmann K et al., Lancet., 354, 1112-1115, 1999
Carr A et al., AIDS, 14(3), 25-32, 2000
Jeong LS et al., J. Medical. Chem. 36, 181-195. 1993
Jeong LS et al., Tetrahedron Lett., 33, 595-598. 1992
Tabas P et al., AIDS 14(4), 63-67. 2000
Machmoudian M. et al., Enzyme Microbiol. Technol., 15, 749-755. 1993
Perry and Faulds, A., Drugs, 53(4), 657-680, 1997
Powderly WG, HIV/Insite/Topics in HIV Medicine, 8(5) 2000
Woo J-H et al., Biotechnol. Letters submitted paper, 2000