

## 핵산유도체들의 항 Human Immunodeficiency Virus *in vitro* 약효평가와 작용기전연구

한국화학연구소 의약활성연구실

이종교 · 김동기 · 김지현 · 김해수 · 피미경 · 박종백 · 김 백<sup>1</sup>

=Abstract=

### *In vitro* Evaluation of Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of Nucleoside Derivatives and Studies on Their Mode of Action

Chong-Kyo Lee, Dong Ki Kim, Jee Hyun Kim, Hae Soo Kim, Mi Kyoung Pi,  
Jong-Beak Park and Baek Kim<sup>1</sup>

Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon  
305-600 Korea, <sup>1</sup>Department of Pathology, University of Washington, Seattle Washington

To evaluate *in vitro* anti-HIV efficacies of nucleoside derivatives, MT-4 cell line was infected with HIV-1 and HIV-2 respectively and treated with various compounds and the formerly approved drugs such as AZT, d4T, ddC and ddI. CPE method was used to evaluate their antiviral activity. Most dideoxynucleosides, AZT, d4T, ddC and ddI, showed anti-HIV activities against both viruses but no other compounds including anti-herpesvirus drugs did any. Further experiments were carried out to study their inhibitory mechanism of viral adsorption. The results showed no inhibition of syncytium formation due to an interaction between the gp120 expressed in HIV-infected cell surface and CD4 receptor on the uninfected cell surface in the presence of AZT. AZT showed no activity up to 100 µg/ml. Inhibition of reverse transcriptase (RT) in the presence of AZT-triphosphate was tested by using RT expressed in *E. coli* and purified and its IC<sub>50</sub> was 4.5 nM.

**Key Words:** Anti-HIV-1, Anti-HIV-2, Nucleoside derivatives, CPE inhibition, Reverse transcriptase

## 서 론

후천성 면역결핍증 (AIDS) [1,2]을 일으키는 human immunodeficiency virus (HIV)의 감염자는 전세계적으로 현재 3,000만명 이상으로 간주되고 있다. HIV-1감염이 대부분이며 HIV-2는 1% 미만이다. 핵산 및 비핵산유도체계열의 역전사 효소 (reverse transcriptase, RT) 저해제, proteinase 저해제들이 현재 AIDS치료제로서 공인되어 복합요법에 이용되고 있지만 감염자로 부터 바이러스를 완전히 박멸시키는 치료제는 아직 개발

되지 않았다. 세포배양 체계를 이용한 항HIV 약효평가지 CPE저해법을 이용한 일차검색에서 효과를 나타낸 약물들은 다양한 종류의 바이러스 균주와 여러 가지 세포종류에서의 약효, 내성균주 출현확인 등의 다양한 시험을 통하여 약효가 검증되어야 하며, 약물의 작용기전도 규명되어야 한다. 일차검색에서 주로 이용되고 있는 MT-4나 MT-2 세포는 바이러스감염 수일 후 세포가 죽게 되어 약물의 약효에 의하여 살아남은 세포수를 직·간접적으로 평가할 수 있기 때문에 대량 약효검색에 주로 이용되고 있다 [3]. 다른 세포들에서는 감염증상이 뚜렷하지 않아 바이러스 core단

백질인 p24항원을 측정하거나 바이러스 역가 등을 측정하여 약효를 판독하고 있다. 따라서, 본 논문에서는 MT-4세포배양체계를 이용하여 CPE 검색법으로 AZT, ddI 등의 핵산유도체들을 이용하여 항HIV-1과 항HIV-2약효를 조사하고, 항바이러스 약효평가시 약효의 재확인 시험에 주로 활용되고 있는 virus 생성량검색과 p24항원검색법을 이용한 AZT의 약효를 조사하였음을 보고 하려한다. 약물의 작용기전연구를 위하여 AZT가 바이러스 세포에의 주 흡착기작인, HIV감염 세포에 발현된 바이러스 gp120 당단백질과 세포의 CD4 receptor와의 결합에 기인한 세포들의 융합으로 야기된 syncytium (SC) (다핵거대세포) 형성을 저해하는 정도와 AIDS치료제 개발에서 가장 집중적인 저해목표였던 HIV RT저해력을 조사하기 위하여 대장균에서 발현된 RT를 이용하여 조사하였음을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포

시험에 이용된 세포들 중 MT-4 (human T-cell transformed by co-cultivating with leukemia lymphocytes harboring HTLV-1) [4]는 일본 동경의과치과대학교의 N. Yamamoto교수로부터, H9 (human cutaneous T-cell)은 [5] 'MRC AIDS Reagent Project'에 의하여 영국 National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC)의 Harvey C. Holmes교수로부터 기증받았는데 원 제공자는 R. Gallo교수로서 'the NIH NIAID AIDS Research and Reference Reagent Program'에 의하여 제공되었으며, HuT 78세포는 ATCC로부터 구입하였다. 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY)가 첨가된 RPMI 1640 (RPMI) (Gibco) 배양액으로 3-4일 마다 계대배양하였다.

### 2. 바이러스

HIV-1 strain III<sub>B</sub> [(HIV-1(III<sub>B</sub>))] [4]과 strain RF [(HIV-1 (RF))] [4], HIV-2 strain CBL20 [(HIV-2 (CBL))] (원제공자 R. Weiss)를 영국의 NIBSC로부터 분양받았다. 각 바이러스를 H9세포에 만성간염시킨 후 3-4일 간격으로 계대배양하였고, 세포를 제거한 원심분리 상등액을 바이러스종균액으로 취하여 -70°C에 보존하고 실험직전에 37°C에 녹여 사용하였다.

### 3. 시험물질

시험에 이용된 화합물들의 이름과 약칭과 제조회사 및 분자량을 Table 1에 표시하였으며 그 밖의 시험물질들은 Lee 등 [6]에 표시한 바와 같다. AZT는 삼천리제약으로부터 기증받았으며 나머지는 구매하였다. 모두 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 20 mg/ml로 녹여 DMSO의 최고농도가 0.5%를 넘지않도록 희석하여 사용하였다.

### 4. 바이러스 역가측정

희석된 바이러스액을 MT-4세포에 감염시키고, 5 일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 다음 현미경관찰과 MTT시험법을 병행하여 cytopathic effect (CPE)를 측정한 다음, CCID<sub>50</sub> (50% cell culture inhibitory dose)값을 구하였다.

### 5. 항바이러스 약효검색

약효검색은 MTT검색법을 이용한 virus-induced CPE 저해법을 이용하였다[3]. 96-well plate에 well 당 2배로 희석된 약물 100 µl와 접종량인 100 CCID<sub>50</sub>이 되도록 바이러스에 감염된 1.0 × 10<sup>4</sup> 개의 MT-4세포 100 µl를 첨가하고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일간 배양한 다음, 현미경관찰과 함께 MTT검색법을 이용하여 살아남은 세포의 수를 cell control (CC)와 비교하여 약물의 항바이러스효과와 독성을 측정하였다. CC와 비교하여 바이러스에 감염된 세포의 50%를 살아남도록 항바이러스효과를 보인 약물의 농도를 EC<sub>50</sub> (50% effective concentration)로서, 바이러스에 감염되지 않은 (mock-infected) 세포의 50%를 죽도록 독성을 나타낸 약물에 농도를 CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration)로 계산하였다.

### 6. HIV p24항원측정

HIV의 p24항원 측정은 HIV-1 p24 core profile ELISA kit (NEN)을 구입하여 설명서에 기술된 바와 같이 사용하였다.

### 7. 다핵거대세포형성

각 바이러스에 만성감염된 H9세포와 감염되지 않은 HuT 78세포와의 세포융합에 의한 SC형성저해를 Schols 등 [8]에 설명된 바와 같이 시험하였다. 약물이 담겨 있는 96-well plate의 각 well에 HuT 78세포와 H9세포를 첨가한 다음 37°C

CO<sub>2</sub> 배양기에서 18 시간 배양한 다음, 현미경으로 약물에 의한 SC형성 저해정도를 판독하였다. Virus control과 비교하여 SC형성을 50% 저해한 약물의 농도를 EC<sub>50</sub>로 계산하였다.

### 8. 역전사효소 활성

Heterodimer인 HIV RT의 p66유전자가 삽입된 plasmid pBK33과 p51유전자의 plasmid pBK45를 각각 *E. coli* BL21에 발현시킨 [8] 다음 His.Bind kit (Novagen, Madison, WI) 설명서에 따라 순수 분리한 다음 단백질 양을 측정하고 각 p66와 p51단백질을 효소검색직전에 동량 섞어 시험에 이용하였다. 효소활성은 각 농도의 약물을 duplicate로 조사하였고 37°C 한시간 반응시킨 다음 TCA 침전법을 이용하여 GF/C filter에 생성물을 포집한 다음 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능을 측정하고 효소활성을 계산하였다. 효소반응액 50 µl 속의 물질조성은 다음과 같았다: 50 mM Tris.HCl, pH 7.8, 75 mM KCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 각 1 mM의 dATP/dCTP/dGTP, 0.5 uCi [<sup>3</sup>H]-TTP (Amersham) (specific activity: 46 Ci/mmol), 0.3 µg poly (rA).(dT)<sub>12-18</sub> mixture (Pharmacia Biotech), 0.04 µg HIV RT.

## 결과 및 성적

### 1. CPE저해법을 이용한 항바이러스약효

실험방법에 기술한 바와 같이 MT-4 세포를 mock, HIV-1 (III<sub>B</sub>)와 HIV-1 (RF) 또는 HIV-2 (CBL)로 각각 well 당 접종량 100 CCID<sub>50</sub>로 감염시켜 5일 간 배양한 다음 각 약물의 항바이러스약효와

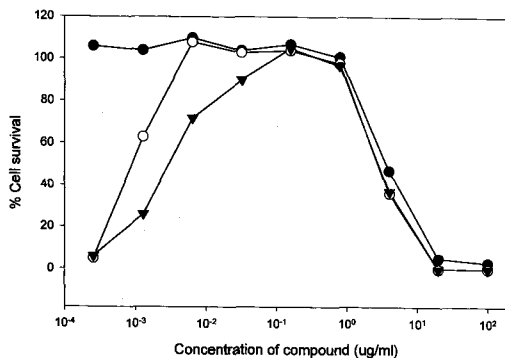


Fig. 1. Anti-HIV activity and cytotoxicity measured by using CPE assay in MT-4 cell culture system. ●, Mock-infected, ○, HIV-1 (III<sub>B</sub>)-infected, ▽, HIV-2 (CBL)-infected.

세포독성치를 현미경 관찰과 MTT를 이용하여 CPE저해도를 측정하여 조사하였다. 각 시험물질을 100 µg/ml을 최고농도로 5 배 연속희석하여 4 - 9 농도로 시험하여 결정한 EC<sub>50</sub>값 (항바이러스 활성값)과 CC<sub>50</sub>값 (세포독성값) 및 SI 값을 Tabel 2에 표시하였으며, AZT의 농도에 따른 약효를 Fig. 1에 표시하였다. AIDS치료제로서 공인된 핵산유도체 시료물질 중에서는 AZT, d4T, ddC, ddI 순서로 항바이러스약효와 SI값을 나타냈으며 ddA, ddT 및 ddU 등의 dideoxynucleoside들의 효과가 관찰되었으나, 항herpesvirus약효를 나타내는 ACV, GCV, IdUrd 등의 화합물들을 포함한 다른 시험약물들에서는 100 µg/ml 또는 CC<sub>50</sub>값 이하에서 약효가 관찰되지 않았다. HIV-1 (III<sub>B</sub>)에 대한 약물저해력이 일반적으로 가장 우수하였다. MT-4세포배양체계에서 AZT의 항바이러스 활성을 CPE검색 시험 최종일에 현미경관찰과 MTT 검색법 이외에 바이러스최종역가와 p24항원발현을 조사하여 비교하였는데 (Table 3), 모두 농도에 따른 유사한 항바이러스약효 결과를 보였다. 단, HIV-2 (CBL)의 경우 효과가 없는 AZT농도에서 역가가 감소한 것은 먼저 증식되어 세포 밖으로 유리된 바이러스들이 불활성화 된 것으로 사료되며, 실험에 이용된 재료로는 HIV-2 (CBL)의 p24항원을 측정할 수 없음을 알 수 있었다.

### 2. 거대다핵세포 형성 저해력

HIV의 세포에의 주 흡착기작인 바이러스 gp 120 당단백질과 세포의 CD4 receptor와의 결합을 저해하는 작용기전을 조하하기 위하여, HIV에

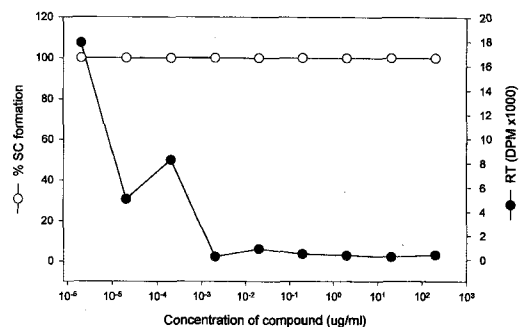


Fig. 2. Dose-response curves for AZT against syncytium formation (○) and for AZT-triphosphate against HIV reverse transcriptase activity (●). Syncytium formation: HIV-infected H9 cells and uninfected HuT 78 cells were cocultured in the presence of AZT for 18 hours. Reverse transcriptase assay: RT expressed in *E. coli* and purified was used.

Table 1. List of the tested compounds

Abbrev	Compounds	Source	F.W
AZT	3'-azido-3'-deoxythymidine	Samchunli	267
AZT-TP	AZT 5'-triphosphate	Moravek	912
8BrAdo	8-bromoadenosine	Sigma	346
5BrCyd	5-bromocytidine	Sigma	322
8BrGuo	8-bromoguanosine	Sigma	362
8BrIno	8-bromoinosine	Sigma	347
5BrUrd	5-bromouridine	Sigma	323
3dzAdo	3-deazaadenosine	Sigma	266
3dzUrd	3-deazauridine	Sigma	243
3'dThd (ddT)	2',3'-dideoxythymidine	Sigma	226
5'dThd	2',5'-dideoxythymidine	Sigma	226
d4T	2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine	Sigma	224
ddA	2',3'-dideoxyadenosine	Sigma	235
ddC	2',3'-dideoxycytidine	Sigma	211
ddI	2',3'-dideoxyinosine	Sigma	236
ddU	2',3'-dideoxyuridine	Sigma	212
5ICyd	5-iodocytidine	Sigma	369
5IdAdo	5-iodo-2'-deoxyadenosine	Sigma	377
5IdCyd	5-iodo-2'-deoxycytidine	Sigma	353
5IUrd	5-iodo-2'-deoxyuridine	Sigma	354

만성 감염된 H9세포와 비감염된 HuT 78을 함께 18 시간 배양한 다음 AZT의 SC형성 저해력을 조사하였다. 이러한 작용기전을 가진 heparin 등의 약물과는 달리 (결과 보고안함) AZT는 최고 100 µg/ml 까지 HIV-1 (III<sub>B</sub>) (Fig. 2), HIV-1 (RF) 및 HIV-2 (CBL)에 저해효과가 없었다.

### 3. AZT의 역전사효소활성 저해력

대장균에서 유전자발현되고, 분리정제된 HIV-1 RT를 이용하여 AZT와 항바이러스활성화 물질인 AZT-TP를 이용하여 HIV RT 저해력을 조사하였다. AZT는 200 µg/ml (750 µM)까지 전혀 RT활성을 저해하지 못하였으나 AZT-TP의 경우 강력한 활성을 나타냈으며 (Fig. 2), IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration)는 4.1 ng/ml (4.5 nM) 이었다.

## 고 찰

새로운 AIDS치료제개발을 위하여 대량 항바이러스약효검색이 가능한 MT-4세포배양체계에서 MTT를 이용한 CPE검색법으로 여러 가지 핵

산유도체들의 항HIV약효를 조사하였다. AIDS치료제로 공인된 약물들과 dideoxy화합물들에서 효과가 관찰되었다. 바이러스에 감염된 세포배양액의 바이러스역가와 HIV core 단백질인 p24 항원측정을 이용하여 AZT의 HIV-1 (III<sub>B</sub>)와 HIV-2 (CBL20)에 대한 약효를 비교하였는데, CPE저해법이나 virus yield 감소법과 p24 항원 감소법 등에 의해 모두 유사한 결과를 나타냈다. 일반적으로 바이러스 역가측정으로 검사하는 virus yield 감소법이 가장 정확한 결과로서 인정되고 있어 약효 재확인 실험에 이용되고 있으나 HIV-2 (CBL)에서와 같이, 세포에서 증식되어 일찍 배양액으로 배출된 바이러스가 불활성화되는 시간이 더 빠르기 때문에 배출 시간의 차이로 인한 바이러스역가 변화가 고려되어야한다. 따라서 바이러스에 따라 적합한 시험조건이 결정되어야 하겠다. p24 항원감소법은 본 연구에서 이용된 NEN사의 측정 kit제품으로는 HIV-2 항원을 감지하지 못함을 발견하였고, 검사 예민성이 가장 낮게 나타났다. 핵산유도체들은 주로 바이러스유전자 증식을 저해하며, 바이러스특이성을 지닌

Table 2. Summary of anti-HIV activity of various compounds in MT-4 cell culture system

Compound	Cytotoxicity and Antiviral activity ( $\mu\text{g/ml}$ )				Selectivity index		
	Mock ( $\text{CC}_{50}$ )	HIV ( $\text{EC}_{50}$ )			HIV		
		HIV-1		HIV-2	HIV-1		HIV-2
		$\text{III}_B$	RF	CBL-20	$\text{III}_B$	RF	CBL-20
ACV	>100	>100	>100	>100	ND	ND	ND
AICAR	42	>42	>42	>42	<1	<1	<1
Ara-A	37	>37	>37	>37	<1	<1	<1
Ara-AMP	30	>30	>30	>30	<1	<1	<1
Ara-C	0.36	>0.36	>0.36	ND <sup>a</sup>	<1	<1	ND
Ara-H	>100	>100	>100	>100	ND	ND	ND
Ara-T	6.1	>6.1	>6.1	ND	<1	<1	ND
Ara-U	82.4	>82.4	>82.4	>82.4	<1	<1	<1
AzaUrd	0.002	>0.002	>0.002	ND	<1	<1	ND
AZT	3.1	0.0009	0.0024	0.0033	3,444	1,292	939
AZT-TP	4.7	0.003	ND	0.008	1,741	ND	566
8BrAdo	1.2	>1.2	>1.2	ND	<1	<1	ND
5BrCyd	42	>42	>42	>42	<1	<1	<1
8BrGuo	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
8BrIno	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
5BrUrd	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
5BrdCyd	82.0	>82	>82	ND	<1	<1	ND
5BrdUrd	9.5	>9.5	>9.5	ND	<1	<1	ND
BVdUrd	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
3dzAdo	27.2	>27.2	>27.2	ND	<1	<1	ND
3dzUrd	0.0032	>0.0032	>0.0032	ND	<1	<1	ND
5'dThd	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
d4T	4.3	0.031	0.071	0.18	139	61	24
ddA	>100	7.5	9.2	11.1	>13	>11	>9
ddC	37.4	0.48	0.9	0.30	78	41	124
ddI	>100	5.8	7.2	8.2	>17	>14	>12
ddT (3'dThd)	>100	0.94	1.7	20.0	>106	>59	>5
ddU	>100	51.8	>100	>100	>2	ND	ND
DMAPR	0.21	>0.21	>0.21	ND	<1	<1	ND
FC	>100	>100	>100	ND	<1	<1	ND
FC-ara	0.023	>0.023	>0.023	ND	<1	<1	ND
FdUrd	1.6	>1.6	>1.6	ND	<1	<1	ND
FTFU	19.9	>19.9	>19.9	ND	<1	<1	ND
FU	0.6	>0.6	>0.6	ND	<1	<1	ND
FUrd	1.6	>1.6	>1.6	ND	<1	<1	ND
GCV	31.7	>31.7	>31.7	>31.7	<1	<1	<1
HoUrd	9.4	>9.4	>9.4	ND	<1	<1	ND
5ICyd	18.8	>18.8	>18.8	ND	<1	<1	ND
5IdAdo	1.8	>1.8	>1.8	ND	<1	<1	ND
5IdCyd	68.2	>68.2	>68.2	ND	<1	<1	ND
5IdUrd	12.8	>12.8	>12.8	ND	<1	<1	ND
MeAdo	24.2	24.2	24.2	ND	<1	<1	ND
MeCMS	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
MeCyd	47.9	>47.9	>47.9	ND	<1	<1	ND
MeThd	6.4	>6.4	>6.4	ND	<1	<1	ND
MeUrd	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
MoPR	2.1	>2.1	>2.1	ND	<1	<1	ND
NU	>100	>100	>100	ND	ND	ND	ND
PsUrd	68	>68	>68	ND	<1	<1	ND
Ribavirin	2.9	>2.9	>2.9	ND	<1	<1	ND
TFT	1.4	>1.4	>1.4	ND	<1	<1	ND

Note. <sup>a</sup> ND, not determined.

**Table 3. Antivital effects AZT monitored with various markers**

Virus	Concentration (µg/ml)	Markers			
		Microscopic observation <sup>a</sup>	CPE (% cell survival) <sup>b</sup>	Virus yield (CCID <sub>50</sub> )	p24 expression (pg/ml)
HIV-1 (III <sub>B</sub> )	100	cytotoxic	0	<10	154
	20	cytotoxic	0	<10	154
	4	cytotoxic	0	<10	165
	0.8	-	57	<10	130
	0.16	-	105	<10	107
	0.032	-	107	<10	153
	0.0064	-	119	<10	165
	0.00128	++	110	3,252	791
	0.000256	++++	23	3,5482	895
	0	++++	0	100,000	908
	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	0.00128	0.00045	ND <sup>2</sup>	0.00271
HIV-2 (CBL20)	100	cytotoxic	0	<10	0
	20	cytotoxic	0	<10	0
	4	cytotoxic	8	<10	0
	0.8	-	90	<10	0
	0.16	-	97	<10	0
	0.032	-	95	20	0
	0.0064	++	59	3,463	0
	0.00128	+++	23	11,253	3
	0.000256	++++	5	3,728	0
	0	++++	0	1,885	1
	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	0.0064	0.00428	ND	ND

Note. Microscopic observation, -, no CPE; +, 1-25 % CPE; ++, 26-50 % CPE; +++, 51-75 % CPE; +++++, 76-100 % CPE, <sup>2</sup>Not determined.

RT저해제가 AIDS치료제 개발에서 가장 큰 작용기전으로 간주되어왔다. 바이러스 증식 초기단계인 binding과 fusion을 저해하는 약물의 작용기전을 확인하는데 이용되는 방법 중의 하나인 SC형성저해 실험과 대장균에서 발견되어 순수 분리된 HIV RT를 이용한 RT활성저해를 이용하여 AZT와 활성물질인 AZT-TP에 대한 AZT의 작용기전이 바이러스 흡착저해가 아니라 RT를 저해하며 활성물질은 AZT-TP임을 확인할 수 있었다.

### 결 론

새로운 AIDS치료제 개발을 위한 약효검색 연구를 위하여 핵산유도체들의 항HIV약효와 세포독성정도를 MT-4세포체계와 CPE검색법을 이용하여 조사하였다. AZT d4T, ddC, ddI 등 AIDS치료제로서 공인된 약물들과 ddT, ddA 등의 약물들이 HIV-1과 HIV-2 모두에 항바이러스약효를 나타냄이 관찰되었다. AZT에 대하여 시험최종

일의 바이러스 역가와 p24 항원을 측정하여 현미경관찰과 MTT를 이용한 CPE검색결과와 비교하였는데, 유사한 결과가 관찰되었다. 작용기전 연구를 위하여 바이러스의 세포흡착저해를 확인할 수 있는 HIV감염세포와 비감염세포와의 융합에 SC형성과 RT활성에 끼치는 AZT의 영향을 조사한 결과 100 µg/ml 까지 SC형성을 저해하지 못하였고, RT활성도 200 µg/ml까지 저해하지 못하였으나, 활성물질인 AZT-TP의 IC<sub>50</sub>는 4.5 µg/ml (4.1 nM) 이었다.

### 감사의 글

MT-4세포를 분양하여 준 일본 동경의과·치과대학교의 N. Yamamoto교수와 MRC AIDS Directed Programme Reagent Project를 근거로 H9세포와 HIV-1 (III<sub>B</sub>)와 HIV-1 (RF)와 HIV-2 (CBL20)를 제공한 영국의 NIBSC의 Harvey C. Holmes교수께 감사드린다. H9세포의 원제공자인 R. Gallo교수와 미국의 NIH NIAID Research and Reference Reagent Program에 감사드리며, HIV-2 (CBL-20)

의 원제공자인 R. Weiss 교수께 또한 감사드립니다. 또한, AZT와 acyclovir를 제공하여주신 삼천리제약에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Centers for Disease Control: Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. *Morbid Mortal Weekly Rep* 30: 250, 1981.
2. Centers for Disease Control: Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. *Morbid Mortal Weekly Rep* 30: 305-308, 1981.
3. Pauwels R, Balzarini J, Baba M, Snoeck R, Schols D, Herdewijn P, Desmyter J, De Clercq E: Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti HIV compounds. *J Virol Methods* 20: 309-321, 1988.
4. Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y: Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294: 770-771, 1981.
5. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC: Detection, isolation and continuous production of cytopathic human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500, 1984.
6. Lee, Chong-Kyo, Rha, Zee S, Kim, Hae S: In vitro evaluation of anti-herpesviral activity of derivatives of nucleic acids and their precursors. *J Korean Society of Virol* 22: 69-76, 1992
7. Schols D, Pauwels R, Baba M, Desmyter J, De Clercq E: Syncytium formation and destruction of bystander CD4+ cells cocultures with T cells persistently infected with HIV as demonstrated by flow cytometry. *J Gen Virol* 70:2397-2408, 1989.
8. Kim Baek, Hathaway TR, LA Loeb: Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Bio Chem* 271: 4872-4878, 1996.