

황련추출물에 의한 HIV-1 복제 저해

송만기 · 이안휘 · 김영호¹ · 이정준¹ · 성영철*

포항공과대학교 생명과학과, ¹KIST 유전공학연구소

Inhibition of HIV-1 Replication by Extract of *Coptis chinensis*

Man Ki SONG, Ann Hwee LEE, Young Ho KIM,
Jung Joon LEE¹ and Young Chul Sung*

Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology,
Pohang, Korea, 790-784, ¹KIST Genetic Engineering Research Institute.

(Received March 10, 1995; accepted May 26, 1995)

Abstract—Natural products, total number of 175, were screened to test for their effect on the replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Five of them, such as *Eriobotrya japonica*, *Eugenia caryophyllata*, *Cuscuta chinensis*, *Glycyrrhiza uralensis*, and *Coptis chinensis* were shown to be effective in inhibiting the replication of HIV-1 in tissue culture and their selectivity indexes were 42, 40, 14, 18 and 65, respectively. To further fractionate *Coptis chinensis*, which is shown to be highest anti-HIV-1 activity, methanol extracts of *Coptis chinensis* were fractionated into methylene chloride at pH3, pH10 and water residue. The selectivity indexes of CH₂Cl₂(pH 3), CH₂Cl₂(pH 10) and water residue were 50, 22 and 98 respectively. Our results show that the water residue of *Coptis chinensis* was the most effective for anti-HIV-1 activity.

Keywords □ Human immunodeficiency virus type 1(HIV-1), natural products, anti-HIV-1 activity, *Eriobotrya japonica*, *Eugenia caryophyllata*, *Cuscuta chinensis*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Coptis chinensis*.

Human immunodeficiency virus(HIV)는 acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)을 일으키는 바이러스로, 전세계적으로 빠른 속도로 전파해 가고 있지만, 아직 이에 대한 뚜렷한 치료제나 백신이 개발되어 있지 않다(Barton, 1993; Margaret 와 Daniel, 1993). 최근에, HIV-1의 복제를 막을 수 있는 물질들이 많이 개발되고 있는데, 주로 HIV-1의 reverse transcriptase나 protease를 특이적으로 저해할 수 있는 물질의 개발이 집중적으로 진행되고 있다(Mitsuya와 Broder, 1987; Varmus, 1988; Dreyer 등, 1989; Urban와 Konvalinka, 1992; Vacca 등, 1991). HIV-1의 reverse transcriptase는 바이러스 복제에 있어 필수적인 효소로, 이 효소의 작용을 특이적으로 억제할 수 있는 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)이 개발되었다(Fischl 등, 1987). 이 AZT를 환자에 처리했을때 바이러스의 양을 줄이고 수명을 연장시키는 효과가 있어 많이 이용되고 있다(Yarchoan 등, 1986).

또한 AZT와 같은 작용을 하면서 효과가 더 나은 2'-3'-dideoxyinosine(DDI)도 의약품으로 이용되고 있다(Yarchoan 등, 1989). 하지만, 최근에 AZT에 대한 저항성 바이러스들이 쉽게 나타 나고 세포 독성이 알려 지면서 AZT의 효과에 많은 의문이 제기되고 있다(Richman 등, 1987; Land 등, 1990). HIV-1의 protease는 바이러스의 gag, gag-pol polyprotein을 절단하는 효소로 이 효소를 억제하면 감염능력을 상실한 바이러스가 만들어 진다(Kohl 등, 1988). 이 효소에 대한 저해제는 주로 substrate transition state 유도체로 HIV-1에 특이적으로 작용하도록 제작되고 있다(Blundell 과 Pearl, 1989).

천연물질을 이용하여 HIV-1 저해제를 찾으려는 연구도 많이 진행되어 dextran sulfate(Mitsuya 등, 1988), N-butyldeoxynojirimycin(Karpus 등, 1988), pepstatin A(Von der Helm 등, 1989) 등이 항 HIV-1 효과를 보인다고 보고 되었고, 생약 추출물(Ono 등, 1989)이나, protoberberine, benzophenanthridine alkaloid(Sethi, 1985)의 reverse transcriptase 저해 활성이 보고 되었으나 아직도

* To whom correspondence should be addressed.

HIV-1에 의한 AIDS를 치료할 수 있는 약품이 없어 효과적인 치료제 개발이 시급한 상태이다.

본 실험에서는 천연물질중에 HIV-1의 복제를 억제할 수 있는 물질을 찾기 위하여 한약으로 쓰이고 있는 총 175종의 재료를 이용하여 HIV-1에 대한 저해 정도를 검사 하였다. 그 결과, 황련(*Coptis chinensis*), 정향(*Eugenia caryophyllata*), 비파엽(*Eriobotrya japonica*), 토사자(*Cuscuta chinensis*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)가 세포에 대한 독성이 없는 농도에서 항 HIV-1 활성을 나타내었고, 이중 활성이 가장 높은 황련의 메탄올 추출물을 pH 3 및 pH 10에서 methylene chloride로 추출하고 수층 잔사를 얻은뒤 각각의 분획에 대한 활성을 측정 한 결과 수층 잔사가 가장 높은 활성을 나타내었다.

실험방법

바이러스 및 세포

실험에 이용한 바이러스는 HIV-1/HTLV-III(B)의 nef gene을 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene으로 치환한 pHXB-CAT1에서 유래하였다 (Terwilliger 등, 1989). 세포는 HIV-1에 의해 syncytium 형성이 잘 이루어지는 CD4⁺ human T cell line인 supT1을 이용하였다. 세포배양 배지는 10% fetal calf serum (FCS)이 들어간 RPMI 1640을 이용하였다.

생약재료

실험에 이용한 천연물질은 총 175종으로 시중의 한약방에서 구입하여 사용하였다.

시료의 제조

수용성 및 메탄올 용해성 시료는 건조한 생약 50g을 물 또는 메탄올 250 ml에 넣어 실온에서 48시간 동안 추출한 후 얻었다. 황련의 용매분획을 제조하기 위하여 건조 황련 3kg을 메탄올로 3회 추출하여 농축하였다. 이중 10g의 농축물을 물 100 ml에 현탁하고 1 N HCl로 pH 3으로 조정 한 후 100 ml methylene chloride로 3회 추출하고 수층은 pH 10으로 조정 한 후 methylene chloride 100 ml로 3회 추출하여 alkaloid 분획과 수층으로 나누었다. 자세한 과정은 Fig. 1에 나타내었다.

세포독성 검사

생약의 세포에 대한 독성을 검사하기 위해 24-well 세포 배양 plate에 2.5×10⁵개의 supT1을 여러가지 농도의 생약과 함께 처리하여 3일 뒤 세포의 개수를 세어 독성을 조사하였다.

생약에 의한 HIV-1의 복제 억제 검사

24-well 세포 배양 plate에 2.5×10⁵개의 supT1과 200 TCID₅₀(50%-tissue culture infective dose)의 HIV-1 그리고 여러가지 농도의 생약을 함께 처리한 뒤 3~4일 후에 HIV-1에 의해 유도된 syncytium의 개수를 측정하여 억제 정도를 검사 하였다. 세포에 대한 독성은 낮으면서 HIV-1의 복제 억제에는 효과적인 생약을 찾기 위하여

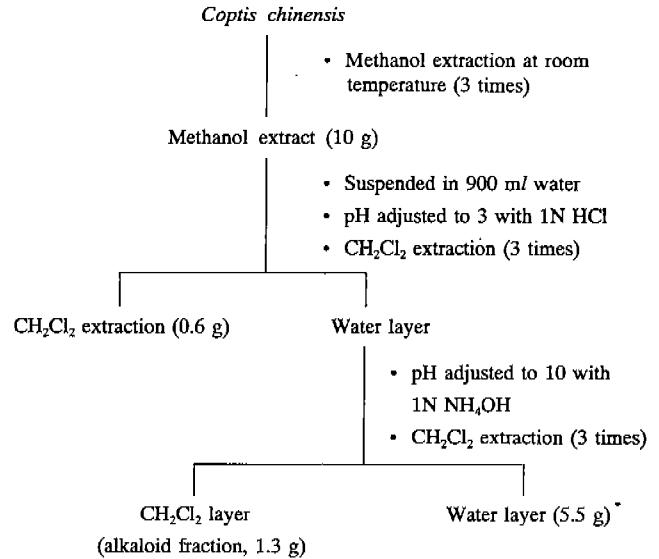


Fig. 1. Fractionation scheme of *Coptis chinensis* methanol extract.

각각의 생약에 대해 selectivity index(SI)를 계산 하였다.

Selectivity index (SI)

$$= \frac{50\% \text{ Cytotoxic dose in supT1 cells (CC}_{50})}{50\% \text{ Inhibitory dose of syncyym formation (IC}_{50})}$$

실험결과

생약의 수용성, 메탄올 용해성 부분에 의한 HIV-1 복제 저해

HIV-1에 감염된 supT1은 여러개의 세포들이 모여 거대세포(syncytium)를 형성하는데 3~4일 후에 inverted microscope를 통하여 바이러스에 감염되지 않은 세포와 쉽게 구별할 수 있다. 본 실험에서 HIV-1 억제제를 찾기 위해 이용한 syncytium forming assay는 바이러스 life cycle(binding, penetration, uncoating, transcription/translation, budding)의 특정 단계에 관계 없이 HIV-1의 복제를 저해하는 물질을 찾을 수 있어 항HIV-1 활성 검사에 많이 이용되고 있다(Nara, P. L.과 Fischinger, P. J, 1988).

실험에서 항 HIV-1 활성도를 측정 한 천연물질은 주로 한약으로 이용되고 있는 것으로, 과학적으로 많은 연구가 이루어진 않았지만 인체에 유용한 성분을 많이 포함하고 있고, 부작용이 적은 것으로 알려져 있어 바로 의약품으로 개발할 수 있는 장점이 있다.

175가지 생약의 수용성 추출물을 여러 농도로 처리하여 supT1에 대한 독성과 항HIV-1 활성을 2면에 걸쳐 측정하여(Table I), 세포에 대한 독성은 작으면서 바이러스에 대한 저해 정도가 큰 5개의 생약을 선별하였다. 이들 5개의 생약은 황련, 정향, 비파엽, 토사자, 감초로

Table I. Natural products tested for anti-HIV-1 activity.

Name	Name
<i>Achyranthes japonica</i>	<i>Boswellia carterii</i>
<i>Aconitum carmichaeli</i>	<i>Buplerum falbatum</i>
<i>Acorus gramineus</i>	<i>Candium monnieri</i>
<i>Agastache rugosa</i>	<i>Canthamus tinctorius</i>
<i>Akebia quinata</i>	<i>Cassialob tusifolia</i>
<i>Alipnia katsumadai</i>	<i>Castanea crenata</i>
<i>Alisma plantago-aquatica</i>	<i>Chaenomelis sinensis</i>
<i>Allium bakeri</i>	<i>Chrysanthemum indicum</i>
<i>Alpinia katsumadai</i>	<i>Cimicifuga davurica</i>
<i>Alumite</i>	<i>Cinnamomum cassia</i>
<i>Amethystea caerulea</i>	<i>Cistanche salsa</i>
<i>Amomum xanthioides</i>	<i>Citrus aurantium</i>
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	<i>Citrus unshiu</i>
<i>Angelica dahurica</i>	<i>Clematis mandohurica</i>
<i>Angelica decursiva</i>	<i>Cnidium officinale</i>
<i>Angelica gigas</i>	<i>Codonopsis lanceolata</i>
<i>Aquilaria agallocha</i>	<i>Codonopsis pilosula</i>
<i>Aralia continontalis</i>	<i>Coix lachryma</i>
<i>Arctium lappa</i>	<i>Commiphora molmol</i>
<i>Areca catechu</i>	<i>Corydalis turtschaninovii</i>
<i>Arisaema heterophyllum</i>	<i>Crataegus pinnatifida</i>
<i>Artemisia vulgaris</i>	<i>Cucurbita moschata</i>
<i>Artemisia jwayomogi</i>	<i>Curculigo orchioides</i>
<i>Asarum sieboldii</i>	<i>Curcuma aromatica</i>
<i>Astragalus membranaceus</i>	<i>Cuscuta japonica</i>
<i>Atractylodes ovata</i>	<i>Curcuma aromatica</i>
<i>Bambusa textilis</i>	<i>Cynanchum atratum</i>
<i>Belamcanda chinensis</i>	<i>Cynomorium songaricum</i>
<i>Bletilla striata</i>	<i>Cyperus rotundus</i>
<i>Boswellia carterii</i>	<i>Daphne genkwa</i>
<i>Dendrobium moniliforme</i>	<i>Lycium chinense</i>
<i>Dianthus chinensis</i>	<i>Lycopus lucidus</i>
<i>Dioscorea batatas</i>	<i>Lygodium japonicum</i>
<i>Diospyros kaki</i>	<i>Magnolia kobushi</i>
<i>Dipsacus japonicus</i>	<i>Magnolia obovata</i>
<i>Dolichos lablab</i>	<i>Massa medicata</i>
<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	<i>Melandryum firmum</i>
<i>Eclipta prostrata</i>	<i>Mentha arvensis</i>
<i>Elscholtzia patrini</i>	<i>Morinda officinalis</i>
<i>Epimedium koreanum</i>	<i>Morus alba</i>
<i>Equus asinus</i>	<i>Neumbo nucifera</i>
<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Ophiopogon japonicus</i>
<i>Eriobotrya japonica</i>	<i>Orixa japonica</i>
<i>Eucommia ulmoides</i>	<i>Ostericum koreanum</i>
<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Pachyma hoelen</i>
<i>Euphobia subulatifolia</i>	<i>Paeonia albiflora</i>
<i>Euphorbia longana</i>	<i>Paeonia japonica</i>
<i>Evodia officinalis</i>	<i>Paeonia suffruticosa</i>
<i>Gardenia jasminodes</i>	<i>Panax ginseng</i>
<i>Gentiana scabra</i>	<i>Paratenodera sinensis</i>
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Patrinia villosa</i>
<i>Grifola umbellata</i>	<i>Perilla frutescens</i>
<i>Haliotis gigantea</i>	<i>Phellodendron amurense</i>
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Phyllostachys nigra</i>
<i>Inula japonica</i>	<i>Picrorrhiza kurroa</i>
<i>Kalopanax pictus</i>	<i>Pinellia ternata</i>
<i>Ledebouriella seseloides</i>	<i>Piper nigrum</i>
<i>Lemma polyrrhiza</i>	<i>Plantago asiatica</i>

Table I. continued

Name	Name
<i>Lepidium apetalum</i>	<i>Platycodon glaucum</i>
<i>Ligusticum tenuissimum</i>	<i>Platycodon grandiflorum</i>
<i>Lilium speciosum</i>	<i>Polygala tenuifolia</i>
<i>Lindera strychnifolia</i>	<i>Polygonatum odoratum</i>
<i>Liquidamber orientalis</i>	<i>Polygonum aviculare</i>
<i>Lithospermum erythorhizon</i>	<i>Polygonum multiflorum</i>
<i>Lonicera japonica</i>	<i>Polygonum sibiricum</i>
<i>Polygonum tinctorium</i>	<i>Scirpus maritimus</i>
<i>Poncirus trifoliata</i>	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>
<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Smilax china</i>
<i>Prunus armeniaca</i>	<i>Solanum lyratum</i>
<i>Prunus japonica</i>	<i>Solanum melongana</i>
<i>Prunus peasica</i>	<i>Sophora flavescens</i>
<i>Pueraria lobata</i>	<i>Sophora subprostrata</i>
<i>Pueraria thunbergiana</i>	<i>Styrax benzoin</i>
<i>Pyrrosia lingua</i>	<i>Suctellaria baicalensis</i>
<i>Quisqualis indica</i>	<i>Taraxacum platycarpum</i>
<i>Rehmannia glutinosa</i>	<i>Thuja orientalis</i>
<i>Reymoutria elliptica</i>	<i>Torreya nucifera</i>
<i>Rhaphanus sativus</i>	<i>Trichosantes kirilowii</i>
<i>Rheum coreanum</i>	<i>Tussilage farfara</i>
<i>Rhus javanica</i>	<i>Typha angustata</i>
<i>Robus coreanus</i>	<i>Ulmus parvifolia</i>
<i>Rosa laevigata</i>	<i>Vinca rosa</i>
<i>Rosa multiflora</i>	<i>Vitex rotundifolia</i>
<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Xanthium strumarium</i>
<i>Santalum album</i>	<i>Zingiber nigrum</i>
<i>Saussurea lappa</i>	<i>Zingiber officinale</i>
<i>Schizandra chinensis</i>	<i>Zyzyphus jujuba</i>
<i>Schizanepea tenuifolia</i>	

SI가 14 이상으로 특이적인 항HIV-1 활성을 보였다. 이들 생약을 제외한 나머지 생약들은 SI가 10 이하로 나타나 더 이상의 실험은 진행하지 않았다. 양성대조군으로 사용한 AZT의 SI는 2000보다 높게 나타났다.

위에서 얻은 5개의 생약에 대해 어떠한 성분이 저해에 효과가 있는지를 보다 좀더 자세히 알기 위해 각각의 생약을 메탄올 용해성과 수용성 두 부분으로 나누어 HIV-1에 대한 저해 정도를 검사하였다(Table II). 황련과 정향은 수용성 추출물의 SI가 각각 65, 40으로 메탄올 추출물의 40, 10보다 1.6배, 4배 높게 나타났고, 비파엽은 메탄올 추출물의 SI가 42로 수용성 추출물의 20보다 2.1 배 높게 나타났다. 하지만 토사자와 감초는 수용성 추출물의 SI가 각각 14, 18, 메탄올 추출물의 SI가 12, 18로 두 부분으로 나누었을때 SI에 큰 차이가 나타나지 않았다.

황련 용매분획의 HIV-1 복제 저해

HIV-1 복제 저해 활성이 가장 높은 황련을 메탄올로 추출한 후 Fig. 1과 같이 pH 3 및 pH 10에서 methylene chloride로 추출하고 수층 잔사를 얻은뒤 각각의 분획의 HIV-1 저해 활성을 황련의 주성분인 berberine과 비교하여 측정하였다(Table III). 메탄올 추출물, CH₂Cl₂(pH

Table II. The effect of syncytium formation and cytotoxicity by medicinal plants extracted with water (A) methanol (B).

		(A)							(B)						
Conc. (ug/ml)		0	0.25	0.5	1.0	5.0	20.0	50.0	0	0.25	0.5	1.0	5.0	20.0	50.0
<i>Coptis chinensis</i>	SF ^a	41	26	15	6	1	0	0	45	29	21	14	3	0	0
	CTE ^b					+	++	+++					+	++	+++
Conc. (ug/ml)		0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200	0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200
<i>E. japonica</i>	SF	38	33	20	15	8	3	0	39	33	15	10	5	2	0
	CTE						++	+++						++	+++
Conc. (ug/ml)		0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200	0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200
<i>G. urolensis</i>	SF	37	33	24	13	10	7	0	40	35	23	14	11	5	0
	CTE						+	++						++	+++
Conc. (ug/ml)		0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200	0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200
<i>Cuscuta chinensis</i>	SF	42	39	30	15	11	5	0	43	35	29	17	12	7	3
	CTE						+	++						+	++
Conc. (ug/ml)		0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200	0	1.0	5.0	20.0	50.0	100	200
<i>E. caryophyllata</i>	SF	45	34	22	12	7	2	0	42	38	32	22	13	6	0
	CTE						+	++						+	++

^aSF represents the number of syncytia formed by HIV-1 in supT1 cells. ^bThe degree of cytotoxicity was represented by +; +: 25% death, ++: 50% death, +++: 75% death of cells.

Table III. The effect of syncytium formation and cytotoxicity by solventfractionated *Coptis chinensis* extract.

Conc. (ug/ml)		0	0.25	0.5	2.5	5.0	25.0	50.0
Methanol extract	SF ^a	35	27	23	11	6	3	1
	CTE ^b				+	++	+++	
CH ₂ Cl ₂ (pH 3)	SF	37	32	26	13	8	2	1
	CTE					+	++	
CH ₂ Cl ₂ (pH 10)	SF	41	31	22	10	0	0	0
	CTE				+	++	+++	
Water residue	SF	42	31	20	4	2	0	0
	CTE					+	++	
Berberine	SF	39	25	20	7	4	2	0
	CTE				+	++	+++	

^aSF represents the number of syncytia formed by HIV-1 in supT1 cells. ^bThe degree of cytotoxicity was represented by +; +: 25% death, ++: 50% death, +++: 75% death of cells.

고 찰

천연물질을 검색하여 항 HIV-1 활성도를 갖는 물질을 찾으려는 연구가 많이 진행되어 여러가지 물질에 대한 보고가 있지만(Mitsuya 등, 1988; Karpus 등, 1988; Von der Helm 등, 1989), 국내의 천연물질에 대한 체계적인 검사는 제대로 이루어지지 않고 있다. 아직까지 안전하고 효과적으로 HIV-1을 억제할 수 있는 물질이 개발되어 있지 않기 때문에 국내의 천연물질에 대한 체계적인 검사가 필요하다고 생각된다.

본 실험에서는 천연물질로부터 부작용은 작으면서 HIV-1에 대한 억제 효과는 큰 물질을 찾기 위하여 생약으로 이용되고 있는 175종에 대해 항 HIV-1 활성도를 측정하였다. 항 HIV-1 활성도는 syncytium forming assay를 통해 측정하였는데, 이 방법은 쉽고 빠르게 활성 결과를 알 수 있을뿐 아니라 많은 물질을 한번에 검사할 수가 있다. 실험에 이용된 대부분의 생약은 HIV-1을 저해하는 농도와 세포에 대한 독성을 나타내는 농도에 큰 차이를 보이지 않아 HIV-1에 대해 특이적인 저해 활성을 찾을 수 없었다. 황련, 정향, 비파엽, 토사자, 감초는 selectivity index가 65에서 14로 AZT의 6200, DDI의 191 (Pauwel 등, 1990) 보다 낮지만 단일 물질이 아니고 여러가지 물질의 혼합물이기 때문에 보다 특이적으로 HIV-1에 대해 억제 작용을 하는 물질을 분리 할 수 있을

3), CH₂Cl₂(pH 10), 수층잔사 각 분획의 SI는 40, 50, 22, 98로 수층 잔사가 가장 높은 활성을 나타내었고, 이 결과는 SI가 42인 berberine 보다 우수 하였다.

것으로 기대된다. 황련과 정향의 경우 수용성 추출물의 항 HIV-1 활성도가 메탄올 추출물 보다 각각 1.6배, 4배 높게 나타나 HIV-1에 대해 특이적인 저해 활성을 보이는 물질이 수용성 부분에 높게 있음을 알 수 있었고 비과엽의 경우는 메탄올 추출물에서 항 HIV-1 활성도가 2.1배 높게 나타났다. 하지만 감초와 토사자의 경우, 두 부분의 항 HIV-1 활성도의 차이가 거의 없었는데, HIV-1의 저해와 세포 독성에 관여하는 물질이 친수성 물질로 구성되어 있기 때문인 것으로 생각된다.

HIV-1 복제 저해 활성이 가장 높은 황련의 메탄올 추출물을 pH 3에서 methylene chloride로 추출하고, 다시 pH 10에서 alkaloid 분획과 수층 잔사를 얻어 HIV-1 저해 활성을 측정한 결과, 수층 잔사가 메탄올 추출물이나 황련의 주성분인 berberine 보다 높은 활성을 나타내어 이 성분을 추적하면 독성은 낮고 항 HIV-1 활성이 높은 물질을 찾을 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Barton, F.H. (1993). Scientific and social issues of human immunodeficiency virus vaccine development. *Science* **260**, 1279-1285.
- Blundell, T. and Pearl, L. (1989). Retroviral proteinase. A second front against AIDS. *Nature(London)* **337**, 596-597.
- Dreyer, G.B., Metcalf, B.S., Tomaszek, T.A., Carr, T.J., Chandler, A.C., Hyland, L., Fakhoury, S.A., Magaard, V.W., Moore, M.L., Strickler, J.E., Debouck, C. and Meek, T.D. (1989). Inhibition of HIV-1 *in vitro*: Rational design of substrate analogue inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9752-9756.
- Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Schooley, R.T., Jackson, G.C., Durack, D.T., King, D. and the AZT Collaborative Working group (1987). The efficiency of azidothymidine(AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS related complex. *N. Engl. J. Med.* **317**, 185-191.
- Karpas, A., Fleet, G.W.J., Dwek, R.A., Petursson, S., Namgoong, S.K., Ramsden, N.G., Jacob, G.S. and Rademacher, T.W. (1988). Aminosugar derivatives as potential anti-human immunodeficiency virus agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9229-9233.
- Kohl, N.E., Emini, E.A. and Schleif, W.A. (1988). Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4686-4690.
- Land, S., Treloar, G., McPhee, D., Birch, C., Doherty, R., Cooper, D. and Gust, I. (1990). Decreased *in vitro* susceptibility to zidovudine of HIV isolates obtained from patients with AIDS. *J. Infec. Dis.* **161**, 326-329.
- Margaret, I.J. and Daniel, F.H. (1993). Present status and future prospects for HIV therapies. *Science* **260**, 1286-1293.
- Mitsuya, H., Looney, D.J., Kuno, S., Ueno, R., Wong-Staal, F. and Broder, S. (1988). Dextran sulfate suppression of viruses in HIV family: Inhibition of virion binding to CD4⁺ cells. *Science* **240**, 646-649.
- Mitsuya, V.J. and Broder, S. (1987). Strategies for antiviral therapy in AIDS. *Nature* **325**, 773-778.
- Nara, P.L. and Fischinger, P.J. (1988). Quantitative infectivity assay for HIV-1 and HIV-2. *Nature* **332**, 469.
- Ono, K., Nakane, H., Meng, Z.-M., Ose, Y., Sakai, Y. and Mizuno, M. (1989). Differential inhibitory effects of various herb extracts on the activities of reverse transcriptase and various deoxyribonucleic acid(DNA) polymerases. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1810-1812.
- Pauwels, R., Andries, K., Desmyter, J., Schols, D., Kukla, M. J., Breslin, H.J., Raeymaeckers, A., Gelder, J.V., Woestenborghs, R., Heykants, J., Schellekens, K., Janssen, M.A.C., Clercq, E.D. and Janssen, P.A.J. (1990). Potent and selective inhibition of HIV-1 replication *in vitro* by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* **343**, 470-474.
- Richman, D.D., Fischl, M.A., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., Lehrman, S., Hirsch, M.S., Jackson, G., Durack, D.T., Phil, D., Nusin-off- Lehrman, S. and the AZT Collaborative Working group (1987). The toxicity of azidothymidine in the treatment of patients with AIDS and AIDS related complex. *N. Engl. J. Med.* **317**, 192-197.
- Sethi, M.L. (1985). Comparison of inhibition of reverse transcriptase and anti-leukemic activities exhibited by protuberberine and benzophenanthridine alkaloids and structure-activity relationships. *Phytochemistry* **24**, 447-454.
- Terwilliger, E.F., Godin, B., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1989). Construction and use of a replication-competent human immunodeficiency virus(HIV-1) that express the chloramphenicol acetyltransferase enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3857-3861.
- Urban, J. and Konvalinka, J. (1992). Reduced-bond tight binding inhibitors of HIV-1 protease. *Fed. Eur. Biochem. Soci.* **298**, 9-13.
- Vacca, J.P., Guara, J.P., de Solms, S.J., Sanders, W.M., Giuliani, E.A., Young, S.D., Darke, P.L., Zugay, J., Sigal, I.S. and Schleif, W.A. (1991). L-687, 908, a potent hydroxyethylene-containing HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.* **34**, 1225-1228.
- Varmus, H. (1988). Retroviruses. *Science* **240**, 1427-1434.
- Von der Helm, K., Gurtler, L., Eberle, J. and Deinhardt, F. (1989). Inhibition of HIV replication in cell culture by the specific aspartic protease inhibitor pepstatin A. *FEBS Lett.* **247**, 349-352.
- Yarchoan, R., Mitsuya, H., Thomas, R.V., Pluda, L.M., Hartman, N.R., Perno, C.F., Marczyk, K.S., Allain, J.P., Johns, D.G. and Broder, S. (1989). *In vivo* activity against HIV and favorable toxicity profile of 2'-3'-dideoxynosine. *Science* **245**, 412-417.
- Yarchoan, R., Weinhold, K.L., Lyerly, H.K., Gelman, E., Blum, R.M., Shearer, G.M., Mitsuya, H., Collins, J.M., Myers, C.E., Klecker, R.W., Markham, P.D., Durack, D.T., Lehrman, S.N., Barry, D.W., Fischl, M.A., Gallo, R.C., Bolognesi, d.P. and Broder, S. (1986). Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS and AIDS related complex. *Lancet* **1**, 575-580.