

마우스 대뇌감염모델을 이용한 Acyclovir의 항Herpes Simplex Virus Type 1 약효평가

한국화학연구소 의약활성연구실

이종교·김해수

=Abstract=

Evaluation of Anti-Herpes Simplex Virus Type 1 Activity of Acyclovir by Using Mouse Intracerebral Infection Model

Chong-Kyo Lee and Hae Soo Kim

Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
Taejon 305-600, Korea

To establish in vivo antiviral evaluation system by using murine herpesvirus intracerebral infection model, 5-6 female BALB/c mice per group aged 5 weeks were inoculated i.c. into cerebrum with different inocular HSV-1 F. Signs of clinical disease noted everyday for one month. Observed were body weight decrease, neurological signs and death caused by encephalitis. Mice discontinued body weight decrease were recovered from the disease, and keratitis was often observed during recovery. The groups inoculated with higher than 1,000 PFU showed 100% mortality and LD₅₀ was <100 PFU/mouse. To study the effect of virus inoculum sizes on antiviral effect of acyclovir (ACV), mice inoculated with different inocula were administered i.p. with different doses of ACV immediately after infection, and twice a day for 5 days. The higher inoculum size, the less protective. ED₅₀ of ACV was >25, >25, 18.4 and 8.0 mg/kg b.i.d. in the group infected with 1,000,000, 100,000, 10,000 and 1,000 PFU/mouse, respectively. LD₅₀ of ACV was 62.5 mg/kg b.i.d. Therapeutic index of ACV was <2.5, <2.5, 3.0 and 7.0 in the groups with inocula 1,000,000, 100,000, 10,000 and 1,000 PFU/mouse, respectively. Inoculum size 1,000 PFU/mouse showing 100% mortality and 5-6 days mean time to death, 5 days drug administration and 14 days observation will be future experimental conditions.

Key Words: Herpes, BALB/c mouse, Intracerebral, Systemic, Acyclovir

서론

항바이러스 연구분야에서 선구자적인 역할을 해온 herpesvirus 치료제 개발은 AIDS 치료제 개발과 함께 가장 많은 관심이 집중되고 있으며 시장

성도 제일 크다 [1,2]. 바이러스특이작용을 저해하는 치료제로서 1962년 최초로 공인된 Idoxuridine 을 포함하여, 바이러스특이작용에 의한 약물활성화로 약효가 우수하면서도 부작용이 적은 대표적인 치료제인 acyclovir (ACV) [3,4]를 포함하여 AIDS 치료제가 집중적으로 개발되기 전까지는 대

Corresponding author: Chong-Kyo Lee, Pharmaceutical Screening Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-600, Korea

부분의 공인된 치료제들은 herpes치료제였다. 초창기의 herpes치료제들은 피부연고제로서만 이용되었고, vidarabine, acyclovir (ACV), penciclovir (PCV), valacyclovir (ACV의 경구투여용 유도체), famciclovir (PCV의 경구투여용 유도체) 등이 뒤늦게 전신투여제로서 개발되었다 [5]. 치료제 개발이 적극적으로 이루어지고 있는 herpes simplex virus type 1 (HSV-1)과 type 2, varicella-zoster virus, cytomegalovirus 이외에 Epstein-Barr virus, human herpesvirus (HHV) type 6와 type 7과 type 8, 모두 8가지 HHV가 알려져 있는데, 다양한 질병들을 유발한다. 이들 모두 증식기작이 복잡하고, 잠복감염력이 있으며, 바이러스 재활성으로 인한 재발병이 문제가 되고 있는데, 이를 저해하는 치료제는 아직 없다. HSV-1은 입술주위에 흔히 나타나는 단순포진 등의 피부질환을 일으키는 것으로 알려져 있으나 뇌염 등의 치명적인 질병을 유발하기도 한다. HSV-1은 세포배양체계에서 증식 및 식별이 용이하여 많은 실험방법들이 개발되어 있다. 또한, HSV 감염동물모델은 여러 가지 동물들을 이용한 다양한 감염방법들이 확립되어 항바이러스치료제 개발을 위한 감염동물모델의 표본이 되고 있다 [6~8]. 마우스 전신감염모델 중 oro-facial herpes 모델인 피부감염을 이용한 zosterimodel [9,10], herpes encenphalitis 모델인 비강감염 [11~13], 복강감염 [14], 대뇌감염법 [15] 등이 있는데, 대뇌감염법은 HSV-1이 사람에게 질병을 유발하는 자연적인 감염법은 아니지만, 손쉽게 치료효과를 조사할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구는 감염동물모델을 이용한 약물의 약효평가방법 확립을 목적으로 마우스 대뇌감염법 (mouse intracerebral infection) 확립을 위한 실험조건설정과 약효평가법 확립을 위하여 표준약물인 ACV를 이용하여 바이러스 접종량에 따른 질병증세 및 치료효과를 조사하여 새로운 hepes치료제 개발에 활용할 수 있도록 하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

HSV-1 strain F (HSV-1 F)를 마우스감염에 이용했으며, 바이러스 증식이나 역가 측정에는 Vero (African Green monkey kidney)세포를 이용했다. 세포의 계대배양에는 5%의 fetal bovine serum (FBS), 바이러스 증식에는 2% FBS가 첨가된 Dulbecco's

Modified Eagle (DME)배지를 이용했다. 바이러스 중균액은 액체질소에 보존했다가 실험직전에 37°C에 녹여 사용했다.

2. 시험동물

한국화학연구소 실험동물실이나 일본 Charles River사로부터 SPF (specific pathogen free) 4 주령의 BALB/c 마우스 암컷을 구입하여, 군당 5~6 마리씩 분류하고 일주일간 항온·항습 사육실에 적응시킨 다음 실험에 이용했다.

3. 시험물질

삼천리제약으로부터 기증받은 acyclovir주사제 (마크로비[®])를 칼슘과 마그네슘 불포함 phosphated buffered saline (PBS)에 50 mg/ml로 녹인 후 시험농도에 따라 PBS로 희석하여 실험에 이용했다.

4. 바이러스 역가측정

바이러스 역가는 plaque검색법과 cytopathic effect (CPE)검색법을 이용하여 조사했는데, DMEM/2% FBS에 연속희석된 바이러스를 Vero세포에 접종시키고 3일간 배양한 다음 48 well plate는 crystal violet로 염색하여 plaque수를 세고, 96 well plate는 MTT검색법을 이용한 CPE검색법으로 조사하여 바이러스역가를 각각 plaque forming unit (PFU)와 CCID₅₀ (50% cell culture inhibitory dose)로서 표시했다 [16].

5. 마우스의 대뇌감염

사육실에서 일주일간 적응된 5 주령의 BALB/c 암컷의 대뇌에 DME/2% FBS로 희석된 바이러스액 50 µl를 직접 주사했다. 각 실험군은 5~6마리로 이루어졌는데 바이러스 대신 DME/2% FBS가 접종된 mock-감염군도 포함되어 있었다. 접종직 전부터 약 한 달동안 매일 마우스의 체중을 측정하고 감염증세를 관찰했다. 감염증세는 사망, 안질환, 뇌염증세 등이었다.

6. 약물투여 효과

약물의 전신투여 효과를 평가하기 위하여 군당 5마리의 마우스를 바이러스로 대뇌감염 시킨 직후에 PBS에 각 농도로 희석된 ACV를 200 µl씩 복강투여를 시작으로 하루 두번씩 5일간 투여했다. ACV의 부작용 조사를 위해 mock-감염

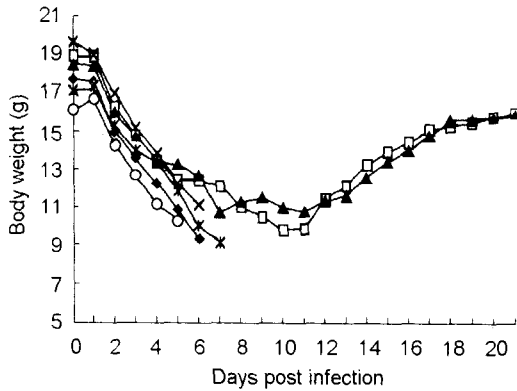


Fig. 1. Body weight changes of each individual HSV-1-infected mouse. Virus inoculum size: 100 PFU/mouse.

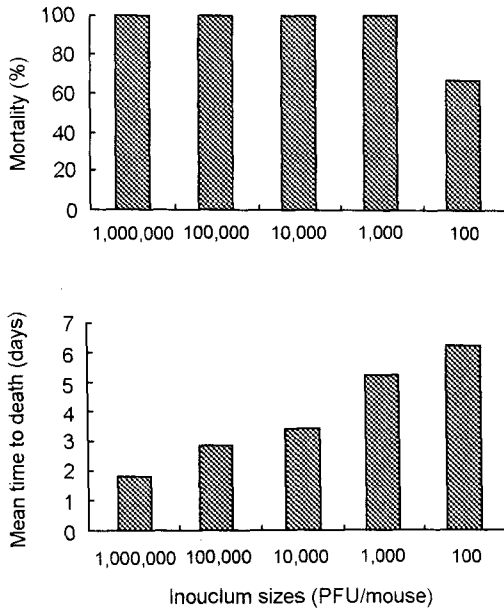


Fig. 2. Effect of different virus inocula on the mortality and the mean time to death of HSV-1-infected mice.

군에도 약물을 투여하여 therapeutic index를 구했다. 약 한 달간 매일 증세관찰과 함께 체중도 측정했다.

결과 및 성적

1. HSV 대뇌감염

대뇌감염법은 zosterimodel이나 비강감염, 복강

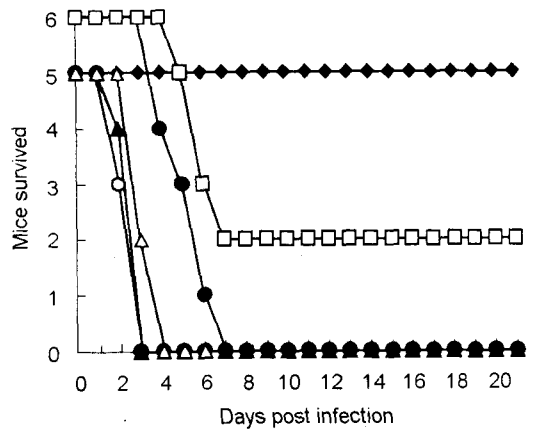


Fig. 3. Effect of different virus inocula on the mortality of HSV-1-infected mice. ◆, 0; ○, 1,000,000; ▲, 100,000; △, 10,000; ●, 1,000; □, 100 PFU.

감염법 등에 비하여 병원성이 크기 때문에 약효 검색을 위한 조건 설정을 위하여 바이러스 접종량에 따른 병원성을 조사하고 100% 사망률을 나타내면서도 약효평가연구에 적합한 조건을 찾는 것이 목적이었다. 사육실에서 일주일간 적응된 5주령의 암컷 BALB/c를 DME/2% FBS에 각 농도로 희석된 바이러스 HSV-1 F 50 μ l를 군당 5~6마리씩 대뇌에 직접 주사해서 접종했으며, DME/2% FBS로만 감염시킨 mock군도 실험에 포함시켰다. 각 군의 평균 체중은 18.3 ± 0.6 g이었다. 매일 생존여부와 함께 증세 및 체중변화를 한 달간 관찰했다. 일반적으로 바이러스에 감염된 마우스는 아무런 증세가 없는 mock군과 달리 체중감소와 함께 눈에 염증이 생기고 행동이상을 나타난 후 죽었는데, 생존기간은 바이러스 접종량에 따라 크게 달랐지만 가장 빠리는 감염 이틀 후 가장 늦게는 감염 후 10일이었다. 체중감소의 멈춤이 감염으로부터의 회복 징후로서 이후 지속적인 체중증가와 함께 질병으로부터 회복되었다. 그러나, 회복중에 각막염증세가 관찰되기도 했다(결과보고 안함). 감염된 마우스들 중 일부가 살아남은 100 PFU/마우스(이후 PFU로 표시)군의 체중변화를 한 예로서 Fig. 1에 표시했다. 바이러스 접종량에 따른 사망률은 1,000 PFU 이상의 접종량에서 100%를 나타냈으며, 100 PFU군은 6마리 중 4마리가 죽어 67%를 나타냈다(Fig. 2). 바이러스 접종량이 증가함에 따라 사망한 마우스들의 평균생존일이 단축되었다(Fig. 2, Fig. 3). 접종량에

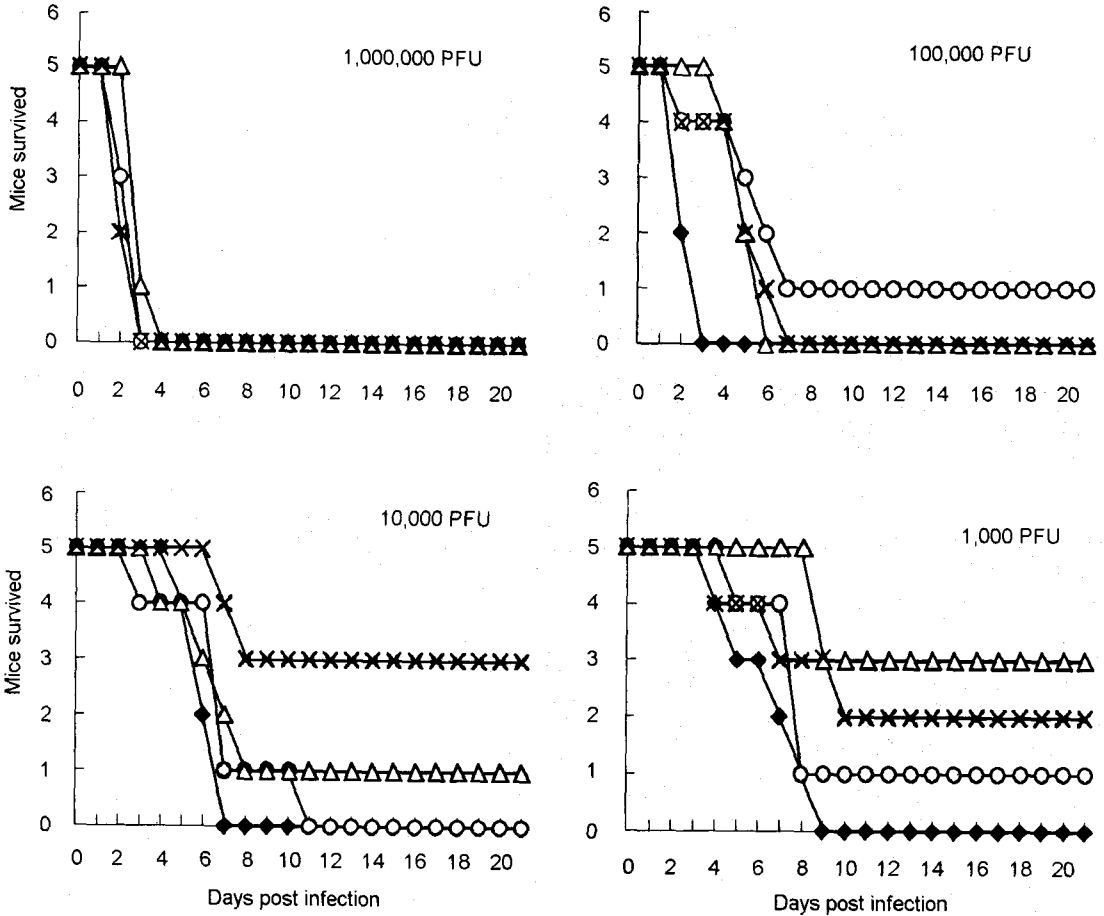


Fig. 4. Effect of different virus inocula and ACV doses on the survival of HSV-1-infected mice ◆, ACV 0; ○, 5; X, 10; △, 25 mg/kg, b.i.d.

다른 평균생존일은 다음과 같다: 1,000,000-1.8, 100,000-2.8, 10,000-3.4, 1,000-5.2, 100-6.0 (PFU-일). Mock군과 100 PFU군의 생존 마우스들은 30일 이상 실험이 끝날 때 까지 살아남았다. 실험결과로 산출한 HSV-1 F의 LD₅₀ (50% lethal dose)는 <100 PFU/ml이었다.

2. HSV 대뇌감염과 acyclovir 치료효과

바이러스에 감염된 마우스들에 대한 약물의 전신투여 효과를 평가하기 위해, DME/2%로 희석된 HSV-1 F 50 µl를 마우스에 주사한 직후 PBS로 희석된 ACV 200 µl 복강투여를 시작해서 하루 두번씩 5일간 투여했다. 투여량은 0, 5, 10, 25 mg/kg, b.i.d. (*bis in die, twice a day*) (이후 b.i.d. 생략)이었다. 군당 5마리씩 일주일간 사육실에서 적응된 5주령의 암컷 BALB/c를 이용했으며, 각 군의 평

균 체중은 18.8±0.5 g이었다. 매일 증세관찰과 함께 체중을 측정했다. 일반적으로 바이러스에 감염된 마우스의 생존기간은 바이러스 접종량과 약물투여량에 따라 달랐지만 가장 빠리는 감염 이틀 후 가장 늦게는 감염 후 11일이었다. 바이러스 접종량과 ACV약효와의 상관관계를 Table 1에 표시하였는데, 일반적으로 ACV투여량이 증가할수록 약효도 함께 증가했다. 그러나, 바이러스 접종량이 증가함에 따라 ACV투여량에 따른 약효의 뚜렷성은 감소했다 (Fig. 4). 접종량이 1,000,000 PFU의 경우 ACV 최고 투여량인 25 mg/kg군의 평균생존일이 2.4일로서 비투여군인 1.6일과 유사했다. 100,000 PFU 이상에서는 5일간의 ACV 투여가 종료되기 전에 모두 죽었으며, 1,000 PFU에서 투여량에 따른 ACV효과가 가장 뚜렷하게 관찰되었다. 각 ACV 처리군의 LD₅₀는 ACV 0

Table 1. Summary of effect of different virus inoculua and ACV doses on HSV-1 infection of mice

| Acyclovir (mg/kg, b.i.d. ¹⁾) | | HSV-1(F) Inoculum (PFU/mouse) | | | | | LD ₅₀ (PFU/mouse) |
|---|-------------------------|----------------------------------|-------|--------|---------|-----------|---------------------------------|
| | | 0 | 1,000 | 10,000 | 100,000 | 1,000,000 | |
| 0 | Dead/total | 0/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | 5/5 | <1,000 |
| | Mean days ²⁾ | na ³⁾ | 6.6 | 6.2 | 2.4 | 1.6 | |
| 5 | Dead/total | nt ⁴⁾ | 4/5 | 5/5 | 4/5 | 5/5 | <1,000 |
| | Mean days | | 7.3 | 7.0 | 5.0 | 2.6 | |
| 10 | Dead/total | nt | 2/5 | 4/5 | 5/5 | 5/5 | 2,081 |
| | Mean days | | 9.0 | 6.3 | 5.2 | 3.2 | |
| 25 | Dead/total | 0/5 | 3/5 | 2/5 | 5/5 | 5/5 | 3,162 |
| | Mean days | na | 7.0 | 7.5 | 5.0 | 2.4 | |
| 50 | Dead/total | 2/5 | | | | | na |
| | Mean days | 4.0 | nt | nt | nt | nt | |
| 100 | Dead/total | 5/5 | | | | | na |
| | Mean days | 1.6 | nt | nt | nt | nt | |
| ED ₅₀ (mg/kg, b.i.d.) | | 56.1 | 8.0 | 18.4 | >25.0 | >25.0 | |
| Therapeutic index | | na | 7.0 | 3.0 | <2.5 | <2.5 | |

¹⁾ b.i.d.: bis in die, twice a day

²⁾ Mean time to death of mice that died

³⁾ na: not applicable

⁴⁾ nd: not tested

ED₅₀ and LD₅₀ were calculated by using Reed and Muench calculation method [17]

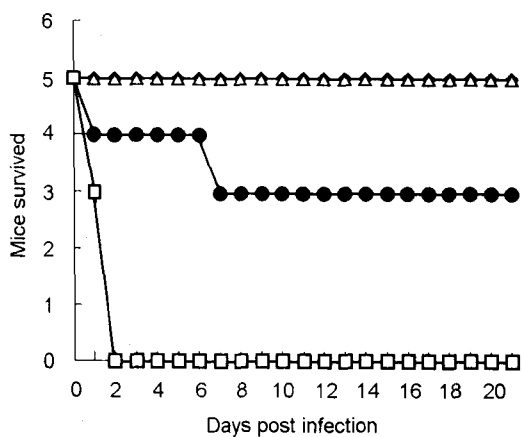


Fig. 5. Effect of different ACV doses on the mortality of mock-infected mice ◆, ACV 0; △, 25; ●, 50; □, 100 mg/kg, b.i.d.

mg/kg의 경우 <1,000 PFU/mouse (0-<1,000으로 표시), 5-<1,000, 10-2,081, 25-3,162로서 ACV투여량이 증가할수록 마우스를 죽이기 위한 바이러스 양이 더 많이 요구되었다. 감염된 마우스의 생존

율을 기준으로 했을때, 각 바이러스 접종량에서의 ACV약효의 지표인 ED₅₀ (50% effective dose)는 1,000,000 PFU군의 경우 >25 mg/kg (1,000,000->25로 표시), 100,000->25, 10,000-18.4, 1,000-8.0로서 접종량이 증가할수록 약효가 감소됨을 알 수 있었다.

ACV의 부작용 조사를 위하여 바이러스감염군과 같은 방법으로 DME/2% FBS를 군당 5마리씩 대뇌에 50 µl 주사하고 ACV를 투여했다 (Table 1, Fig. 5). ACV 100 mg/kg군에서는 투여 하루나 이틀 후 5마리 모두 죽었으며, 50 mg/kg군에서는 2마리가 죽었는데 평균생존일은 4일이었다. 25 mg/kg군의 생존율은 100%였으나 투여기간 중 미약한 체중감소가 관찰되었으나 투여 중지 후 회복되었다 (결과 보고안함). 사망률을 기준으로 한 ACV의 부작용지표인 LD₅₀는 56.1 mg/kg이었다. 이 값을 기준으로 산출한 therapeutic index (LD₅₀/ED₅₀)는 바이러스 접종량 1,000,000, 100,000, 10,000, 1,000 PFU 순으로 각각 <2.5, <2.5, 3.0, 7.0순으로 증가했다.

고 찰

질병모델이 다양한 HSV-1 감염동물모델들 중의 하나인 마우스 대뇌감염법은 과량의 바이러스 접종시는 약효를 판독할 수 없을 정도로 병원성이 강하며, 사람에게 HSV-1이 감염하는 자연적인 방법은 아니라는 단점이 있다. 그러나 hairless 마우스가 아닌 이상 접종을 위해 동물의 털을 깎아야 하고 감염 후에도 털을 깎아 증세를 판독해야 하는 zosterimodel이나 감염시 마취가 요구되는 비강감염법에 비하여 접종이 간편하며, 바이러스 증식부위인 뇌에 직접 바이러스를 주입하기 때문에 소량의 바이러스로서도 질병을 유발하며 짧은 시간에 결과를 알 수 있다는 장점이 있다. 항바이러스제의 in vivo약효평가지고려해야 할 점은 많겠지만 [18], 바이러스접종량 결정은 매우 중요하다. 이는 접종량이 너무 높으면, 약물 투여량에 따른 약효차이를 관찰할 수가 없는데, 본 연구결과에서도 대뇌접종량을 100,000 PFU 이상을 이용하였을 경우 신뢰성 있는 ACV치료효과 조사가 어렵다는 것을 알 수 있었다. 접종량이 너무 낮은 경우에는 동물 개체간의 차이로 인한 질병지표의 변화로 인하여 control군으로서의 역할상실 문제가 있다. HSV 동물실험시 가급적 90% 이상의 사망률을 나타낼 수 있는 접종량을 사용하는데, 실험 군당 실험동물의 수가 적을 경우에는 불충분하다 하겠다. 본 연구결과 HSV-1 F 1,000 PFU 이상의 접종량에서 100% 사망률을 나타냈지만 접종량 증가에 따라 평균 생존일도 감소하였는데, 이는 접종량이 너무 높아 약물이 치료효과를 발휘하기 전에 감염동물이 죽어버릴 가능성이 있다 하겠다. 따라서 결과 및 성적 1항의 실험에서 사망률 100%, 평균생존일 5.2일, 2항 실험에서 사망률 100%, 생존율 6.0일을 보여준 1,000 PFU를 향후 약효검색 실험에 이용하기로 결정했는데, 이는 LD₅₀의 10배 이상의 양이며, 본 실험실에서 활용하고 있는 zosterimodel의 1/500, 비강감염모델의 1/1,000의 양이다 (결과 보고안함). 각 실험 조건에서 마우스의 사망일이 빨리는 이틀, 가장 늦게는 11일이었는데, 감염 후 14일이면 생존한 마우스의 회복이 거의 관찰되었기에 앞으로의 실험기간은 14일로 결정했다. 마우스 대뇌감염 바이러스 접종량 1,000 PFU 군에서의 ACV치료효과인 ED₅₀ 8.0 mg/kg와 부작용지표인 LD₅₀ 56.1 mg/kg값

으로부터 산출한 therapeutic index 7.0는 Vero세포 체계에서 CPE저해법으로 산출한 selectivity index >125 [EC₅₀ (50% effective concentration) 0.8 µg/ml, CC₅₀ (50% cytotoxic concentration)를 >100 µg/ml] 보다 17배 이상 낮은 값으로 in vitro약효와 in vivo약효와의 차이가 있음을 알려주고 있다. 앞으로, in vivo약효평가를 위하여 동물의 사망율이나 증세감소를 판독하는 평가 뿐만 아니라, 감염시 바이러스증식이 일어날 수 있는 동물체내 조직들에서의 바이러스 증식변화 및 잠복감염 여부 등을 확인하여 약효평가의 정확성을 기하며, 약물의 치료효과를 예측하는데 중요한 혈중농도 측정 등의 약물학적 연구가 요구되며 in vitro와 in vivo간의 약효결과들에 대한 정보 축적이 중요하다 하겠다.

결 론

마우스 대뇌감염법확립을 위하여 HSV-1 F를 여러가지 접종량으로 군당 5~6마리씩 5 주령의 BALB/c 암컷의 대뇌에 직접 주사하고 한 달간 관찰했다. 증세는 체중감소, 안질환, 뇌염으로 인한 사망이었다. 체중감소의 멈춤이 감염으로부터의 회복 징후였으며, 회복 중에 간혹 각막염증세가 관찰되었다. 1,000 PFU 감염군까지 100% 사망률을 나타냈으며, LD₅₀는 <100 PFU였다. 바이러스 접종량이 끼치는 ACV의 치료효과에 대한 영향을 조사하기 위하여 여러 가지 접종량으로 대뇌 감염된 마우스에게 여러 가지 투여량의 ACV를 하루 두번씩 5일간 복강주사하고 한달간 치료효과를 관찰했다. 접종량이 클수록 ACV약효는 뚜렷이 감소했다. 치료효과를 나타내는 지표인 ED₅₀는 100,000 PFU 이상의 경우 >25 mg/kg, 10,000 PFU는 18.4 mg/kg, 1,000 PFU는 8.0 mg/kg이었다. 부작용 지표인 LD₅₀는 56.1 mg/kg으로서 therapeutic index는 바이러스 접종량 1,000,000, 100,000, 10,000, 1,000 PFU 순으로 각각 <2.5, <2.5, 3.0, 7.0 순으로 증가했다. 상기 결과들을 참고하여 향후 약효평가를 위한 실험조건으로서 HSV-1 F 접종량은 1,000 PFU/마리, 약물투여기간 5일, 관찰기간 14일로 정했다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업의 일환으로 1997년도 용역사업인 HMP-97-D-5-0031 연구과제의 지원에 의해 수행되었기

에 이에 감사드립니다. 그리고 mouse 대뇌감염법 확립에 많은 도움을 주신 수의과학연구소의 김재훈 연구사님과 벨기에 Rega연구소의 Erik De Clercq 교수님과 acylcovir를 기증하여 주신 삼천리제약에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. De Clercq E: Trends in the development of new antiviral agents for the chemotherapy of infections caused by herpesviruses and retroviruses. *Rev Medical Virol* 5: 149-164, 1995.
2. De Clercq E: In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin Microbiol Rev* 10: 674-693, 1997.
3. Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, De Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ: Selectivity of action of an antiherpetic agents, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5716-5720, 1977.
4. Elion GB: The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother* 12 (suppl B): 9-17, 1983.
5. Griffiths PD: Progress in the clinical management of herpesvirus infections. *Antiviral Chem Chemother* 6: 191-209, 1995.
6. Hsiung GD, Chan VF: Evaluation of new antiviral agents: II. the use of animal models. *Antiviral Res* 12: 239-258, 1989.
7. Kern ER: Animal models as assay systems for the development of antivirals. p. 149-172. In De Clercq E, Walker RT (Ed.) *Antiviral drug development* Plenum Press, New York 1988.
8. Sutton D, Kern ER: Activity of famciclovir and penciclovir in HSV-infected animals: a review. *Antiviral Chem Chemother* 4 (Suppl 1): 37-46, 1993.
9. Blyth WA, Harbour DA, Hill TJ: Pathogenesis of zosteriform spread of HSV in the mouse. *J Gen Virol* 65: 1477-1468, 1984.
10. Simmonds A, Nash AA: Zosteriform spread of herpes simplex virus and its use to investigate the role of immune cells in prevention of recurrent disease. *J Virol* 52: 816-821, 1984.
11. De Clercq E, Luczac M: Intranasal challenge of mice with herpes simplex virus: an experimental model for the evaluation of efficacy of antiviral drugs. *J Infect dis* 133: A226-A236, 1976.
12. Kern ER, Richards JT, Overall Jr JC, Glasfow LA: Alteration of mortality and pathogenesis of three experimental herpesvirus hominis infections in mice with adenine arabinoside 5'-monophosphat, adenine arabinoside and phosphonoacetic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 13: 53-60, 1978.
13. Gold SE, Boyd MR, Field HJ: Effects of penciclovir and famciclovir in a murine model of encephalitis induced by intranasal inoculation of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Chem Chemother* 3: 37-47, 1992.
14. Kuemel G, Kirchner H, Zawatsky R, Engler H, Schroder CH, Kaemer HC: Experimental infection of inbred mice with herpes simplex virus. V. Investigations with a virus strain non-lethal after peritoneal infection. *J Gen Virol* 63: 315-323, 1982.
15. Collins P, Oliver NM: Comparison of the in vitro and in vivo antiherpesvirus activities of the acyclic nucleosides, acyclovir and BWB759U. *Antiviral Res* 5: 145-156, 1985.
16. Lee C-K, Kim HS: The replicative cycle of HSV-1 and in vitro evaluation of antiviral agents. *J Kor Soc Virol* 22(2): 227-233, 1992.
17. Reed LJ, Muench HA: A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 27: 493-497, 1938.
18. Kern ER: Preclinical evaluation of antiviral agents. p. 79-111. In Galasso GJ, Whitley RJ, Merigan TC (Ed.), *Antiviral agents and human viral diseases*. Lippincott-Raven Inc, New York, 1997.