

새로운 항바이러스 물질의 약효검색

이종교

한국화학연구소 의약활성연구팀

서론

항바이러스제 개발을 어렵게 하는 여러 가지 문제점들도 불구하고 최근 몇 년간 괄목할 만한 진전이 있어왔다. 기존의 역전사효소저해제에 바이러스 protease저해제를 첨가한 병용요법이 AIDS치료분야에서 이룬 부분적인 성공과 influenzavirus (Flu) 치료제로서 neuramidase저해제의 발견 및 picornavirus에 대한 광범위 치료제 개발 등이 그 예이다. 또한 human immunodeficiency virus (HIV)와 hepatitis B virus (HBV)에 동시에 작용하는 약물, 또는 herpes simplex virus (HSV)와 HBV 등에 동시에 작용하는 광범위 치료제 개발을 위한 임상 실험들이 진행되고 있다. 그러나 새로운 항바이러스제 개발의 필요성은 계속 요구되고 있다[1,2].

이는 새로운 바이러스들이 계속 발견되고 있으며, 이미 알려진 바이러스들이라 할지라도 치료제 및 백신이 개발되지 않은 바이러스 질환들이 많고, 개발되었다 할지라도 부작용이나 제한된 약효 때문에 제한된 환자에게 제한된 투여조건으로만 공인된 경우도 많으며, 병용요법의 경우 복용의 복잡성과 높은 치료비용 및 부작용 등의 문제점들이 있기 때문이다. 또한 치료제가 전무한 바이러스의 잠복감염 때문이기도 하다. 수 년간 큰 진전을 이룬 AIDS치료제의 경우에도, HIV 저해제 3 종류 이상을 병용하는 경우라 할지라도 현재 기술로는 바이러스의 박멸은 이루어지지 못하는 것이 확인되었다.

또한 바이러스 증식을 저해할 수 있는 약물의 체내농도를 유지하지 못할 경우에는 내성바이러스 출현으로 이용약물의 효력을 상실할 수 있으며, 교차 내성을 나타내는 다른 약물은 이용될 수 없도록 할 수 있다는 문제점들을 제기하고 있다. 이와 같은 경험은 다른 바이러스들에 대하여도 적용됨이 계속 확인되고 있다. 따라서 저렴하고 복용이 용이하며 장기적인 복용시에도 안전한 약물들이 개발되어야 하며, 기존 약물과 병용하여 사용할 수 있거나 교차내성을 나타내지 않는 새로운 치료제들의 개발 필요성이 부각되고 있다.

최근의 항바이러스제 개발동향은 치료제가 아직 개발되지 않은 바이러스치료제 개발, 새로운 작용기전을 가진 약물 개발, 기존 약물과 함께 병용요법에 활용될 수 있는 약물 개발, 기존 약물의 타 바이러스질환에 활용가능성 타진 및 약물의

Table 1. Variables in screening plant extracts

Antiviral activity	Test protocol
Prophylactic effects	Preinfection treatment · incubate extract with cells · wash off · add virus
Virucidal effects	Preinfection treatment · incubate extract with virus · add to cells · remove after adsorption of virus
Virustatic effects	Postinfection treatment · infect cells with virus · remove unadsorbed virus · add medium with extract

체내흡수율 증가나 일정 이상의 농도를 오래 유지할 수 있도록 기존 약물의 변형이나 체내 전달기술 확립 등이다. 치료제 개발에 대한 관심이 집중되는 바이러스들은 HIV[3], herpesvirus[4], HBV나 C형 간염바이러스 (HCV)[5], Flu[6], picornavirus[7], papillomavirus[8], 사망률이 높거나 생물전이나 테러목적에 이용될 수 있는 smallpox virus, Ebola virus 나 yellow fever virus 등의 exotic virus들이다[9] [Table 1]. HIV의 경우 체내 바이러스 박멸을 어렵게 하는 M-tropic 바이러스에 작용하는 약물과 병용요법에 이용할 수 있도록 CD4 이외의 coreceptor와의 결합 및 융합, HIV integrase 등의 새로운 작용기전 저해제에 개발연구와 이미 개발된 작용기전의 경우일지라도 교차내성을 피할 수 있는 약물들에 대한 연구가 활발하다. Herpesvirus의 경우 protease 저해제나 잠복감염으로부터의 재활성 저해제 등에 대한 연구가 활발하다.

항바이러스제 스크리닝

합리적인 항바이러스제 스크리닝을 위하여 고려하여야 할 점들 중 개발 대상 바이러스가 선정되어 그에 대한 약효검색이 이루어져야 하며, 약물의 독성검색도 필수적으로 수반되어야 한다는 점은 특히 중요하다. 새로운 항바이러스제 개발시 독성 검사를 제외한 전임상실험에서 중요한 약효평가내용들은 다음과 같다.

- In vitro 항바이러스활성과 세포독성검사를 통한 selectivity index (SI) 결정
- 약물의 작용기전 확인
- 기존 약물에 대한 내성바이러스에 대한 활성여부
- 약물에 대한 내성바이러스 출현 여부 및 출현시 관련 유전자의 염기서열 확인
- 기존 약물들과의 병용효과 조사
- 광범위 바이러스활성 조사
- In vivo 항바이러스 약효와 부작용 검사를 통한 therapeutic index (TI) 결정
- 약물동태학적 조사 (특히 바이러스증식을 억제할 수 있는 약물의 혈중농도 유지 여부)

In vitro 항바이러스활성과 세포독성검사를 통한 SI 결정

시료가 준비된 상태에서 in vitro 검색은 항바이러스제 개발의 첫째 관문이다[10, 11]. 바이러스에 따라 세포배양의 용이성이 다른데, 이는 약물개발과정에 큰 영향을 끼친다. HIV, HSV, Flu 등은 세포배양체계에서의 약효검색체계가 잘 확립되어 대량검색도 가능하나, HBV의 경우 제한적인 세포배양체계 때문에 대량 검색이 어렵고, HCV의 경우는 아직 효율적인 세포배양체계가 확립되어 있지 않아 시험관 검색에 의존하고 있다. 역전사효소나 proteinase 등의 효소검색처럼 시험관에서 할 수 있는 시험들은 소요기간이 짧고 비용이 저렴할 수도 있다는 장점이 있으나, 바이러스의 종류에 따라 효소의 특성이 다를 수도 있고, 세포내 침투 및 활성화 여부를 확인할 수 없으며, 바이러스 증식과정에 필수적인 또 다른 기작을 저해하는지를 확인할 수 없다는 단점들이 있다. 특히, 정해진 lead compound가 없는 경우에는 세포-바이러스체계를 이용한 바이러스 증식저해 관찰은 더 효율적일 것이다. 세포-바이러스체계를 이용하여 바람직한 검색을 하기 위해서는 다음 점들을 유의하여야 한다.

첫째, 시험바이러스에 대한 적당한 세포체계의 선정이다. 가급적 빠른 시간에 식별이 가능한 cytopathic effect (CPE)를 나타내고 plaque형성이 가능한 사람세포가 바람직하며 두 종류 이상의 세포사용을 권장한다. 그러나 바이러스 종류에 따라 CPE조차 나타내지 않을 수 있으므로 그에 적합한 검색법을 선정하여야 한다. 둘째, 바이러스의 여러 균주들에 대한 약효를 조사할 필요가 있는데, 특히 약제내성균주에 대한 검색을 한다. 셋째, 시료의 여러 농도에 따른 항바이러스효과 (dose response curve)를 조사해야 한다. 넷째, 약물이 세포에 끼치는 독성 값을 항바이러스 약효 값으로 나누어 준 SI를 산출하여 개발을 지속할 만큼 SI값이 높은지를 확인하여야 한다. 다섯째, 표준약물들을 실험할 때마다 control로 사용하여 실험상태를 확인하여야 한다는 점 등이다. 바이러스에 감염된 세포가 CPE와 plaque을 나타낼 경우 plaque 감소법이나 CPE 저해법

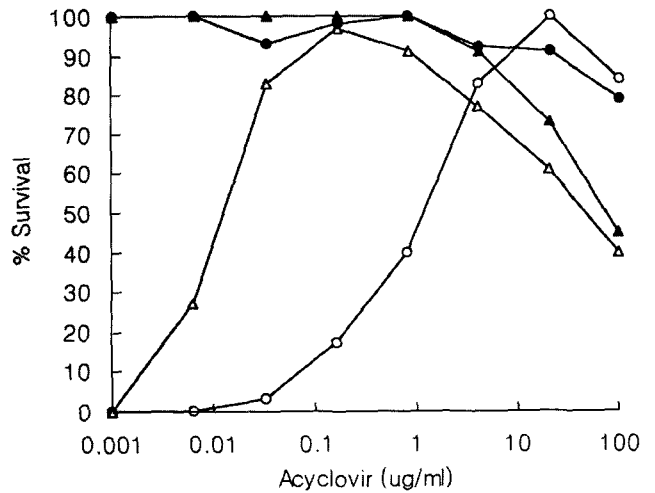


Fig. 1. Dose response curves for acyclovir against HSV-1 in Vero or BALB/3T3 cells ○, HSV-1 (F) in Vero; △, HSV-1 (F) in BALB/3T3; ●, mock in Vero; ▲ mock in BALB/3T3

이나 virus yield 감소법을 이용하여 항바이러스 약효검색을 수행하는데, 주로 CPE 저해법을 이용하여 일차 검색을 하고 이차로 plaque 감소법이나 virus yield 감소법을 이용하여 시료의 약효를 재확인한다. CPE를 나타내지 않는 경우, 바이러스가 유발하는 혈구응집이나 세포 transformation 등의 특이한 기능들과 DNA나 RNA나 단백질 등의 바이러스 생산물을 직접 추적하거나 유리된 virion이 가지고 있는 항체나 효소의 활성을 측정하여 약효를 조사한다. Herpes 치료제인 acyclovir (ACV)의 항 HSV type 1 효과와 mock-감염군을 이용한 cytotoxic 효과를 원숭이 유래 세포인 Vero세포와 마우스 유래 세포인 BALB/3T3세포에서 CPE저해법으로 조사하여 Fig. 1에 표시하였다. 균주 F에 대한 ACV의 독성값인 CC₅₀는 Vero와 BALB/3T3세포에서 각각 >100, 75 ug/ml이고, 항바이러스 약효를 표현하는 EC₅₀는 1.2와 0.012 ug/ml이며 SI는 >83과 6,250으로 세포에 따라 값이 다를 수 있다.

약물의 작용기전 확인

약효검색에서 시험물질이 항바이러스효과를 나타낼 경우 증식 저해기전을 확인하는 것은 연구의 지속여부를 결정하는데 매우 중요하다. 시료가 나타내는 항바이러스효과가 바이러스 증식의 특이기작 저해하는 virustatic이 아닌 virucidal 효과 (일종의 소독효과) 또는 예방효과 (바이러스 감염으로부터 세포에 대한 보호효과) 때문이 아닌지도 우선 확인하여야 한다 [12]. Table 2 에 간단한 실험방법을 표시했다. Virucidal효과는 시료와 함께 일정 시간 배양된 바이러스를 세포에 감염시킨 다음 바이러스 증식 저해정도를 조사하는데, 이 경우 전처리 배양시간 길어질수록 저해효과는 크게 증가하게 된다. 어떤 약물과 바이러스를 전배양시켰을 경우 시간이 지날수록 약물이 첨가되지 않은 control에 비하여 바이러스 역가가 크게 떨

Table 2. Potential targets for antiviral chemotherapy

Target viruses	Target enzymes or mechanisms
Human immunodeficiency	Reverse transcriptase, protease, integrase, coreceptors, fusion, nucleocapsid, gene regulation, gene expression, M-tropic strains, etc
Herpes (herpes simplex type 1 and 2, varicella-zoster, human cytomegalo, Epstein-Barr, human herpes type 6, 7 and 8)	Protease, TK, ICP34.5, ICP0, DNA replication, etc
Hepatitis B	RT, DNA polymerase, RNase H
Hepatitis C	Protease, helicase, RNA polymerase
Influenza and other respiratory (influenza, respiratory syncytial, parainfluenza, measles, etc)	Adsorption, penetration, uncoating, transcription, RNA replication, release
Picornia (human rhino, coxsackie type A and B, echo, etc)	Adsorption, uncoating, RNA replication
Papilloma	E oncoprotein, DNA replication
Exotic virus (Ebola, Lassa, Hantaan, smallpox, monkeypox, etc)	SAH hydrolase, RNA replication

어지는 것을 Fig. 2에 표시했다. 세포에 약물을 첨가하여 일정 시간 전처리한 다음 바이러스를 감염시킨 다음 약효가 증가할 경우에는 시료가 예방효과를 가진 것으로 추측할 수 있는데,

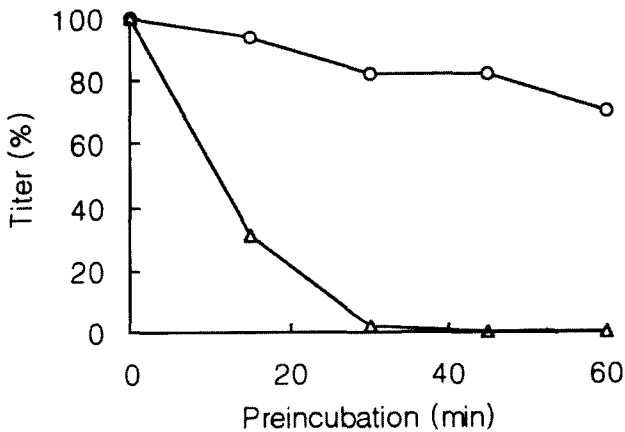


Fig. 2. Effect of preincubation with viruses and a virucidal compound ○, virus control; △, virus with the compound

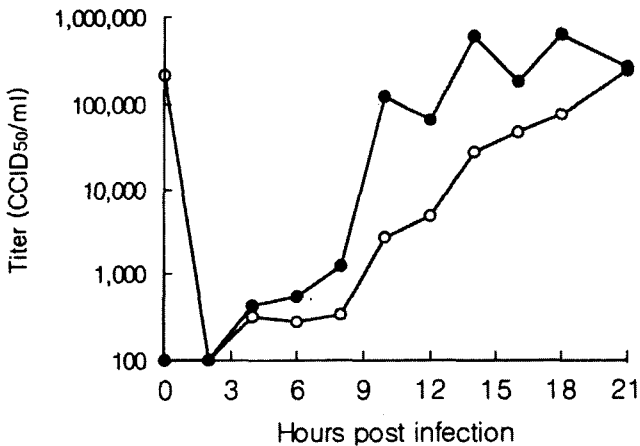


Fig. 3. One step grow curves of HSV-1 strain F in Vero cells. ○, released infectious virus; ●, cell-associated infectious viruses

interferon이 한 예이다. Virustatic 효과일 경우 예로서 바이러스가 세포막에 붙거나 융합하는 등의 바이러스 증식과정 중 초기 기작을 저해하는지, 유전자 합성 등의 중간 기작을 저해하는지, 바이러스 숙성이나 세포밖 배출 등의 말기 기작에 관여하는지 등의 기전을 확인해야 한다. 바이러스의 성장곡선을 알고 있으며 바이러스가 세포에 끼치는 영향이 뚜렷할 경우에는 time of addition(TOA)이나 time of removal 실험으로 예측할 수 있다. 전자의 경우에는 약물의 첨가 시작 시간을 단계적으로 늦추어 약효를 나타내는 최고로 늦은 시간을 조사하고, 후자의 방법은 감염과 동시에 약물을 넣고 단계적으로 약물을 제거한 다음 어느 단계까지 약효가 나타나는지를 조사하여 성장곡선이나 유전자 전구물질의 이용율을 조사한 합성곡선 등과 비교한다. HSV-1가 세포와 결합하거나 융합하는 것을 저해하는 dextran sulfate와 바이러스 DNA 합성을 저해하는 것으로 알려진 acyclovir와 1-β-D-arabinofuranosylthymine(ara-T)를 이용하여 TOA 실험을 결과는 다음과 같다. 모든 Vero 세포가 한 번에 감염될 수 있도록 과량의 HSV-1 strain F를 감염시키고 세포안과 세포 밖으로 유리되는 바이러스의 역가를 조사하여 one step growth curve를 그릴 수 있다(Fig. 3). 바이러스 감염 후 시간을 점차 늦추어 약물을 첨가한 다음 22 시간 후에 모든 세포와 배양액을 회수하여 바이러스 역가를 측정하거나(Fig. 4a), CPE검색법을 이용한 시간별로의 EC50 값을 결정하여 (Fig. 4b) 약효의 작용기전을 예측할 수 있는지 확인할 수 있다. 초기 단계를 저해하는 DS의 경우 감염 1 시간 후에는 이미 약효가 관찰되지 않았으며, DNA 합성 저해제들은 합성이 거의 끝나는 시간인 11 시간 전까지는 약효를 나타낼 수 없다[13].

기존 약물에 대한 내성바이러스에 대한 활성여부

숙주세포에 영향을 주지않고 바이러스 증식기작을 특이적으로 저해하면 저해할수록 내성바이러스 출현이 거의 필연적이라고 인정되고 있다. 바이러스가 약제 내성을 나타내는 작용기

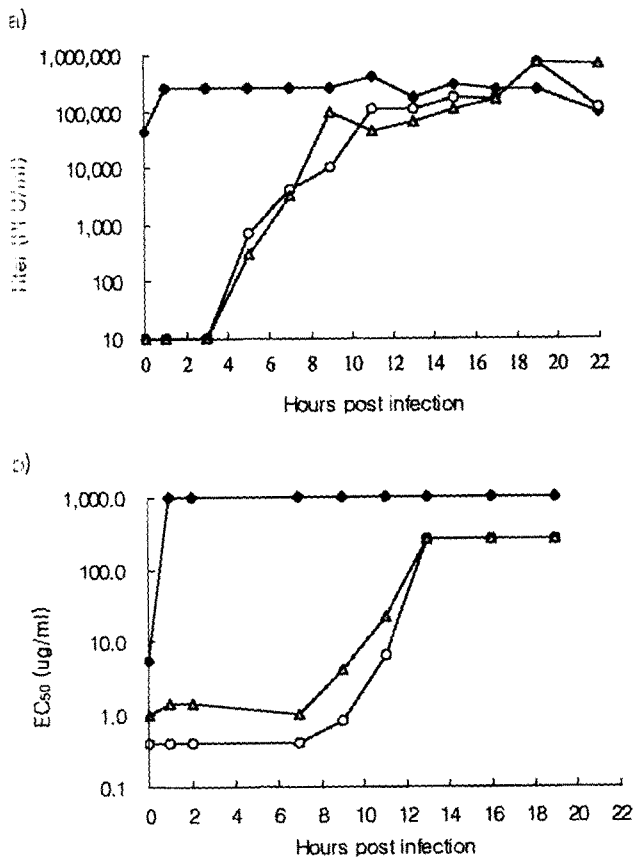


Fig. 4. Time of addition experiment by virus yield (a) and by CPE inhibition assay (b). ◆, Dextran sulfate (molecular weight 5,000); ○, acyclovir; △, ara-T

전은 바이러스 특이 효소나 receptor들의 돌연변이에 의한다. HIV RT, protease와 rhinovirus의 uncoating 저해제에 대한 HSV의 thymidine kinase(TK) 또는 DNA polymerase의 유전자의 돌연변이가 잘 알려져 있다. 따라서 약물의 개발가치를 평가하는데 있어서, 기존 약물에 대한 내성 바이러스의 증식저해여부를 확인하는 일은 매우 중요하다 하겠다. HSV-1의 TK-deficient 돌연변이 균주가 나타내는 ACV에 대한 내성과 HSV-1 TK를 발현하는 세포에서는 내성이 사라지는 것을 Fig. 5에 표시하였다. 세포 TK조차 발현되지 않는 143B세포에서 wild type인 균주 F의 EC₅₀는 1.8 ug/ml이고 내성균주 AR1의 경우 44.7 ug/ml로서 25 배의 내성을 나타내는데, TK발현세포인 FTK143B세포에서는 각각 0.8 과 1.2 ug/ml로서 감수성이 되살아남을 확인할 수 있다.

약물에 대한 내성바이러스 출현 여부 및 출현시 관련 유전자의 염기서열 확인

개발하려고 하는 약물에 대한 내성바이러스가 세포배양체계에서 출현할 것인지, 얼마나 빨리 출현할 것인지, 관련 유전자의 돌연변이 위치는 어떠한지를 조사하는 것의 AIDS치료제

개발에서는 거의 필수적이 되었고, 다른 바이러스들에 대해서도 적용되고 있다. 약제내성 바이러스가 잘 출현하는 바이러스의 경우 더욱 필요한데, 사용중인 약물이 바이러스 증식을 완벽히 저해하지 못할 경우 내성바이러스 출현은 필연적인 것으로 간주하기 때문이다. 세포배양체계가 임상체계와 동일하지는 않지만, 내성 발생시기는 약물개발 전략 및 환자에게 약물 투여시 용법, 용량 등에 중요한 정보를 제공하게 된다. 바이러스 약제내성은 교차내성이 자주 관찰되기에 유전자의 돌연변이 위치가 기존의 약물과 동일할 경우에는 약제내성 바이러스가 나타난 환자에게 신약을 쓰더라도 약효가 없을 것이기에 개발가치가 낮아진다. 핵산유도체 계열과 비핵산 유도체 계열의 역전사 효소저해제나 protease 저해제 여러 종류가 공인되어 사용되고 있는 AIDS 치료제 분야에서는 약물의 개발 가치를 결정하는데 매우 중요하다.

기존 약물들과의 병용효과 조사

두 종류 이상의 약물을 이용하여 치료하는 병용요법은 AIDS치료에서 획기적인 치료효과를 나타냈으며, 다른 바이러스 질환 치료에도 병용요법 시도가 이루어지고 있다. 이는 서로 상승작용을 나타내는 약물들을 사용하면 각 약물의 용량을 줄일 수 있어 부작용을 줄이고, 효과는 상승시키며, 약제 내성 발현율을 낮추거나 지연시킬 수 있다는 장점이 있다. 세포배양체계를 이용하여 실험할 경우 약효에 대한 isobologram을 그려 상승효과를 나타내는지, 독성도 함께 증가하지는 않는지를 조사해야한다. Dideoxyuridine(ddI)와 ribavirin(RIB) 두 약물을 HIV에 감염된 peripheral blood lymphocytes에 병용투여했을 때의 약효와 독성을 Fig. 6에 표시했는데, RIB이 첨가되지 않았을 경우에 ddI의 HIV strain IIIb에 대한 EC₅₀값은 0.58 ug/ml이었다가, RIB 첨가농도가 0.4, 1, 2, 4, 10, 20

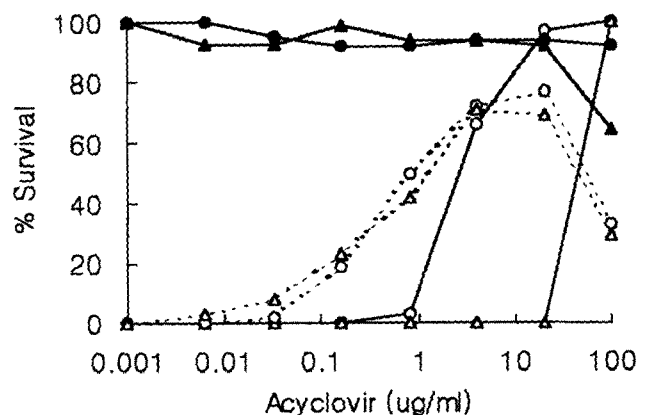


Fig. 5. Dose response curves for acyclovir against HSV-1 strain F and AR1 in 143B or FTK143B cells —○—, HSV-1 (F) in 143B; —△—, HSV-1 (AR1) in 143B; --○--, HSV-1 (F) in FTK143B; --△--, HSV-1 (AR1) in FTK 143B; —●—, Mock in 143B; —▲—, mock in FTK143B

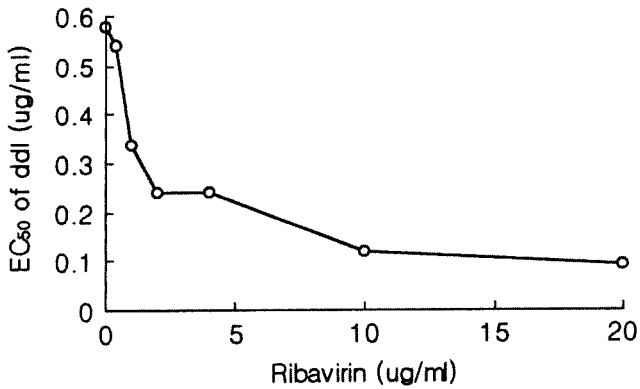


Fig. 6. Potentiating effect of ribavirin on the anti-HIV-1 activity of ddI in PBL cells.

ug/ml로 증가할수록 ddI의 EC₅₀는 0.54, 0.34, 0.24, 0.24, 0.12, 0.09 ug/ml로서 점점 감소하였고, 독성치인 CC₅₀는 각 경우 모두 >10 ug/ml 이상으로 변하지 않아 이들 약물이 서로 상승작용을 가짐을 알 수 있다[14].

광범위 바이러스 활성 조사

개발 대상인 바이러스 외에도 다른 바이러스에 대한 약효를 조사하는 것은 새로운 치료제 개발 가능성과 가치를 올려준다. 한가지 시료로 가급적 여러 종류의 바이러스에 대한 약효검사를 수행하면 항바이러스 물질을 발견할 가능성이 증가할 것이다. 그러나 검색방법의 용이성 및 검색에 필요한 양과 비용 및 인력 등도 고려해야 할 것이다. 어떤 시료가 특정 바이러스에 약효를 나타낼 경우, 같은 속에 속하는 다른 바이러스들에 대해서도 약효를 나타내는지도 조사해야 할 것이고, 다른 바이러스라 할 지라도 공통점을 지닌 대상에 대해서도 조사할 필요가 있다. HIV 역전사효소 저해제를 가지고 DNA 바이러스이지만 RT를 지닌 HBV에 대한 약효평가를 하는 것이 한 예이다.

In vivo 항바이러스약효와 부작용 검사를 통한 TI 결정

In vivo 약효검사의 경우 치료제 개발목표인 바이러스를 실험동물에 감염시키거나, 감염이 안될 경우 실험동물에 감염하는 유사한 바이러스를 감염시키거나 transgenic 동물을 이용하거나 recombinant 바이러스를 이용한다[11, 15]. 바이러스에 따라 감염동물모델 존재 여부가 다르며, 같은 바이러스일지라도 다양한 감염동물 및 질병모델이 있다는 점을 고려하여야겠다. 감염동물모델에서 항바이러스 약효평가는 약물의 부작용 검사와 함께 항바이러스 활성을 임상적인 측면, 바이러스 증식 측면 및 조직 병리학적으로 판단하며 TI값을 결정해야 한다. 일반적으로 감염에 이용되는 바이러스 균주의 종류, 접종량, 접종 부위, 감염모델, 동물의 주령과 체중 및 성별 등의 요인에 따라 바이러스의 발병기전에 큰 차이가 있을 수 있으며 [16], 약물투여 시작 시간과 투여기간과 용량 및 용법 등에 따라 생물산업

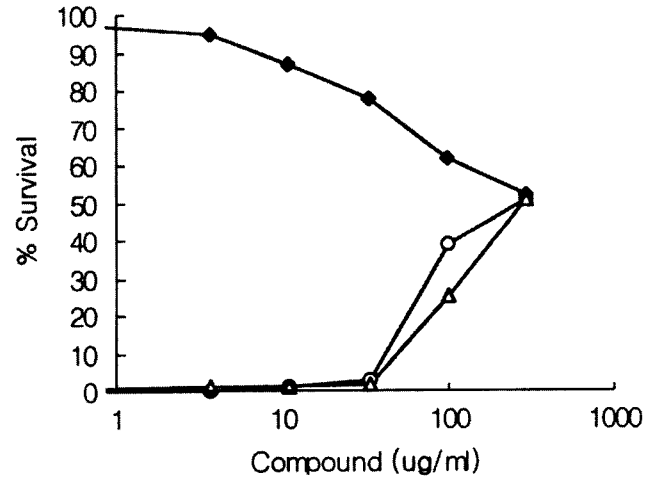


Fig. 7. Antiviral activity and cytotoxic effect of a tested compound ○, HSV-1 strain F; △, HSV-2 strain MS; ◆, mock

라서 약효에도 큰 차이가 날 수가 있기 때문에 이에 대한 연구도 이루어져야한다.

약물동태학적 조사

바이러스 치료제의 효과를 유지하기 위해서는 바이러스 증식을 지속적으로 저해할 수 있는 체내 혈중 농도 유지가 필수적인데, 세포배양체계에서 조사되는 EC₅₀ 값이 기준이 된다. 따라서 약물 대사 및 약물동력 또는 동태학적 특성조사가 이루어져야 하는데, 특히 혈중농도 관련 조사는 필수적이다.

맺음 말

동·식물 및 미생물로부터 유래한 천연물 시료 중 이미 분리·정제가 끝난 시료들에 대해서는 여러 종류의 바이러스에 대한 활성평가가 이루어짐이 바람직할 것이며, 항바이러스 물질을 분리·정제할 계획인 경우에는 검색시 요구되는 시료량, 검색기간, 검색비용, 검색기관과의 연계성을 고려하여야 한다. 약효결과 판독시에는 항바이러스 효과를 나타내는 농도에서의 세포 독성결과를 확인하여야 한다. 이는 미약한 세포독성을 나타내는 농도에서의 항바이러스 효과를 나타내는 SI값이 낮은 시료의 경우, 바이러스 특이적 저해라기 보다는 세포가 바이러스의 증식을 도울 수 없는 상태로 일어난 결과일 수 있기 때문에 한 두 단계의 분리정제 과정을 거치면서 SI값의 증가여부를 관찰하여 개발가치를 판단하여야겠다. 한 예로서 천연물로부터 유래된 어떤 시료의 항HSV효과를 Fig.7에 표시하였다. 시료가 300과 100 ug/ml에서 HSV-1에 대하여 51%와 38%, HSV-2에 대하여 51%와 21%의 항바이러스 효과를 나타냈지만, 약물만이 첨가된 mock의 경우 52%와 62% 세포 생존율을 나타내 독성이 있으며, 독성을 나타내지 않는 농도에서

는 항바이러스 활성도 관찰되지 않는 것으로 보아 개발가치를 판단하기 위해서는 더 많은 실험이 요구된다 하겠다. 시료가 나타나는 항바이러스 효과가 바이러스 증식의 특이기간 저해하는 virustatic이 아닌 virucidal 효과 또는 예방효과 때문이 아닌지의 확인도 필수적이다.

AIDS출현이후 집중적인 항바이러스제 개발 및 관련 연구를 통하여 바이러스가 항바이러스제로부터 생존하는 방법의 다양성과 복잡성을 확인하게 되었고 체내에서의 박멸이 얼마나 어려운가를 경험하게 되었다. 이 때문에 치료제 개발을 위한 검색조건도 갈수록 다양해지고 어려워지고 있다. 그러나 많은 수의 시료에 대한 목표연계된 또는 무작위 검색을 통하여 어렵게만 여겨지던 치료제 개발에 큰 성과가 있어 왔으며, 그 성과는 앞으로 더욱 뚜렷이 가시화 될 것이다. 우리나라에도 천연물 자원과 화학관련 물질들이 많이 존재하는데, 이에 대한 체계적인 약효평가 계획이 수립되고 실행되면 새로운 항바이러스제 발견 가능성이 매우 높다 하겠다.

참고문헌

- De Clercq, E. 1997. In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clinical Microbiology Review* **10**: 674-693.
- Jones, P.S. 1998. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **9**: 283-302.
- Daelemans, D., A.-M. Vandamme, and E. De Clercq. 1999. Human immunodeficiency virus gene regulation as a target for antiviral chemotherapy. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **10**: 1-14.
- Holwerda, B.C. 1997. Herpesvirus proteases: targets for novel antiviral drugs. *Antiviral Research*. **35**: 1-21.
- Main, J., B. McCarron, and H.C. Thomas. 1998. Treatment of chronic viral hepatitis. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **9**: 449-460.
- Shigeta, S. 1998. Approaches to antiviral chemotherapy for acute respiratory infections. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **9**: 93-107.
- Diana, G.D., and D.C. Pevear. 1997. Antipicornavirus drugs: current status. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **8**: 401-408.
- Phelps, W.C., J.A. Barnes, and D.C. Lobe. 1998. Molecular targets for human papillomaviruses: prospects for antiviral therapy. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **9**: 359-377.
- Kortepeter, M.G., and G.W. Parker. 1999. Potential biological weapons threats. *Emerging Infectious Diseases* **5**: 523-527.
- Hu, J.M., and G.D. Hsiung. 1989. Evaluation of new antiviral agents: I. in vitro perspectives. *Antiviral Research* **11**: 217-232.
- Kern, E.R. 1997. Preclinical evaluation of antiviral agents. In "Antiviral Agents and Human Viral Diseases" 4th ed. ed by Glasso GJ et al. Lippincott-Raven. p79-111.
- Hudson, J.B. 1990. Antiviral Compounds From Plants. CRC Press.
- Lee, C.-K., and H.S. Kim. 1992. The replicative cycle of herpes simplex virus type 1 and in vitro evaluation of antiviral agents. *Journal of Korean Society of Virology* **22**: 227-233.
- Balzarini, J., C.-K. Lee, D. Schols, and E. De Clercq. 1991. 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Ribavirin) and 5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) markedly potentiate the inhibitory effect of 2',3'-dideoxyinosine on HIV in peripheral blood lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **178**: 563-569.
- Field, H.J., and G.A. Brown. 1989. Animal models for antiviral chemotherapy. *Antiviral Research* **12**: 165-180.
- Lee, C.-K., and H.S. Kim. 1998. Evaluation of anti-herpes simplex virus type I activity of acyclovir by using mouse intracerebral infection model. *Journal of Korean Society of Virology* **28**: 63-69.