

Human Immunodeficiency Virus Type I 에 대한 음나무 추출물의 억제활성

유영범* · 심범상¹ · 안규석¹ · 최승훈² · 박종철³ · Miyashiro H.⁴ · Hattori M.⁴

한국한의학연구원 의료연구부, 1: 경희대학교 한의과대학 병리학교실, 2: WHO 서태평양지역사무국 전통의약담당,
3: 순천대학교 한약자원학과, 4: 일본도야마의과약과대학 화한약연구소

The Extracts of *Kalopanax pictus* Nakai. for Inhibitory Effects on HIV-1 and Its Essential Enzymes

Young Beob Yu*, Bum Sang Shim¹, Kyoo Seok Ahn¹, Seung Hoon Choi², Jong Cheol Park³,
Hirotoku Miyashiro⁴, Masao Hattori⁴

* Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Jeonmindong 461-24, Yuseonggu, Daejeon 305-810, Rep. of Korea

1: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 1, Hoeigidong, Dongdaemungu,

Seoul 130-701, Rep. of Korea 2: WHO Western Pacific Regional Office, P.O. Box 2932, 1000 Manila, Philippines

3: Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Rep. of Korea

4: Research Institute for Wakan Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

For the purpose of developing new anti-HIV agents from natural sources, the extracts of *Kalopanax pictus* were tested for their inhibitory effects on HIV-1 replication and its essential enzymes as the reverse transcriptase (RT), protease and α -glucosidase. In the assay of HIV-1-infected human T-cell line, water extracts of stem and leafstalk inhibited the HIV-1-induced cytopathic effects with IC (inhibitory concentration) of 25 and 50ug/ml, respectively. Moreover water extracts (100ug/ml) of stem and leafstalk showed strong activity of 80% and 90% on anti-HIV-1 RT using Enzyme Linked Oligonucleotide Sorbent Assay (ELOSA) method. In the HIV-1 protease inhibition assay, aqueous stem extract inhibited the activity of the enzyme to cleave an oligopeptide, resembling one of the cleavage sites in the viral polyprotein which can only be processed by HIV-1 protease with 58%, but no glucosidase inhibitory activities. We found out this result, for these samples it is possible that the inhibition of the viral replication in vitro is due to the inhibition at least one of RT and protease. It would be of great interest to identify the compounds which are responsible for this inhibition, since all therapeutically useful agent up to date are RT, PR and α -glucosidase inhibitors.

Key words : *Kalopanax pictus*, anti HIV-1, reversetranscriptase, protease, α -glucosidase

서 론

천연물을 대상으로 한 에이즈 치료제 연구가 광범위하게 이루어지고 있다¹⁻⁵⁾. 본 연구에서는 에이즈의 원인 바이러스인 HIV-1의 주요 효소와 그 바이러스를 대상으로 한국산 식물들의 부제역제 효능을 살펴보았으며 그 중 음나무 추출물의 활성효능이 탁월하여 보고하고자 한다. 음나무(*Kalopanax pictus* (Tunb.)

Nakai)는 오갈피나무과(Araliaceae)에 속하는 높이 20-25m의 낙엽교목으로 수피는 흑갈색이고 세로로 깊게 갈라져 있고 잎은 길이 10-30cm의 장상엽이며 가장자리에 잔톱니가 있다. 꽃은 지름 4-5mm 이며 연한 황색이고 꽃잎과 수술은 각각 4-5개이다⁶⁾. 우리나라에서는 해동(海桐)으로 중국에서는 자추수피(刺楸樹皮)로 불리우며, 거풍습, 활혈, 소종, 진통, 항균, 항진균작용이 있어서 류머티스에 의한 풍습비통, 이질, 치통, 개선, 골절동통 등에 쓰여져 왔다⁷⁾. 음나무 화학성분으로는 kalopanaxsaponin 등 다수의 saponin 성분이 보고되었고⁸⁾, flavonoid 성분⁹⁾, benzopyrin, neolignan 성분¹⁰⁾ 등이 알려져 있다. 음나무의 약리활성으로는 항

* 교신저자 : 유영범, 대전시 유성구 전민동 한국한의학연구원 의료연구부

· E-mail : ybyu@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9487

· 접수 : 2004/05/25 · 수정 : 2004/06/30 · 채택 : 2004/07/27

당뇨작용과 항 진균작용, 항 돌연변이작용, liriodendrin의 간보호 활성과 부종억제효과 등이 보고되어 있으나^{11,12)} 으나무의 HIV 억제 활성에 관한 보고는 발견되지 않았다.

본 연구에서는 으나무 잎, 줄기, 엽병의 물 및 메탄올 엑스를 이용하여 HIV-1 기원의 효소인 reverse transcriptase 억제활성을 ELOSA(Enzyme Linked Oligonucleotide Sorbent Assay) 방법으로 실험하였고, HIV-1 protease 억제활성을 기질 분해를 HPLC로 검출하는 방법으로, 그리고 α-glucosidase의 억제활성은 p-nitrophenyl-α-D-glucoside의 분해를 spectrophotometer로 각각 측정하였다. 식물엑스의 항 HIV-1 복제억제활성은 MT-4 세포에 대한 HIV-1 유도 세포변성억제를 광학현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

시료로 사용한 으나무는 전남 순천시 난봉산에서 채취한 후 순천대학교 한약자원화학과에서 동정한 후 잎, 줄기, 엽병을 통풍이 잘 되는 곳에서 음건 세절하여 추출용 시료로 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Plant materials

Sample No.	Used parts	Extract solvents
1	leaf	H ₂ O
2	leaf	methanol
3	stem	H ₂ O
4	stem	methanol
5	leafstalk	H ₂ O
6	leafstalk	methanol

2. 시약 및 기기

용매는 특급 및 1급 시약을 사용하였다. Microplate washer는 Immunowash model 1250(Biorad, Nippon Biorad KK, Tokyo, Japan)을, microplate reader는 Biorad 3550-UV(Biorad, Nippon Biorad KK, Tokyo, Japan)를, HPLC는 [System controller: Shimadzu SCL-6B, Pump: Shimadzu LC-9A, Detector: Shimadzu SPD-6A(UV spectrophotometric detector), Recorder & integrator: Shimadzu C-R6A Chromatopac.]을 각각 이용하였다.

3. 시료의 추출

시료 5 g을 각각 물(100 ml) 또는 메탄올(100 ml)로 3시간씩 열수 추출한 후 감압농축하여 메탄올의 최종농도가 2%가 넘지 않게 동결건조하여 활성실험의 재료로 사용하였다. 시료는 활성 실험시에 멸균된 증류수나 DMSO에 100 µg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

4. HIV-1 reverse transcriptase 활성 억제

Reverse transcriptase(RT) 억제활성 실험은 Dupont사로부터 구입한 RT-Detect™ kit NEK-070A (Dupont medical products, Boston, MA, USA)를 이용한 ELOSA 방법으로 4℃ 이하에서 저장하면서 assay 조건을 설정하였다. 효소는 유전자 재

조합에 의해 생산된 HIV-1 RT (10 U/µl, 100 mM potassium phosphate, pH 7.1, 1 mM dithiothreitol, 50% glycerol)를 효소완충액[100mM Tris-HCl, pH 8.0, 160 mM KCl, 1 mM EDTA, 3 mM dithiothreitol, 0.3% (v/v) Triton X-100, and 10 % (v/v) glycerol]에 0.005 U/µl로 희석하여 사용하였고 반응혼합물 (reaction mixture)은 primer가 부착된 RNA template와 triphosphate-DNA nucleosides를 반응혼합물 완충액(reaction buffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM MgCl₂)에 희석하여 사용하였다. 역전사 효소의 활성억제는 10 µl 반응혼합물 완충액, 20 µl 반응혼합물, 4 µl 식물추출물, 5.2 µl 효소완충액을 500 µl test tube (ependorf)에 넣고 37℃에서 4분간 예비배양한 후 효소 0.8 µl를 가해 37℃에서 1시간동안 역전사시키고 90℃에서 1분간 반응을 정지시켰다. 반응을 마친 RNA template를 알칼리용액(5.62% potassium hydroxide, 94.38% water)으로 37℃에서 15분간 가수분해한 후, 완충액 (13.6% sodium phosphate, monobasic monohydrate, 86.4 % water)으로 중화하였다. ELOSA 반응을 위해 중화시킨 반응액 50 µl를 streptavidin-coated microplate well에 옮기고, horseradish peroxidase(HRP)-labeled detector probe와 biotin-labeled capture probe를 포함하는 ELOSA 용액 50 µl 첨가하여 37℃에서 2시간동안 배양하였다¹³⁾. 반응을 마치고 microplate well에 남은 시약이나 가수분해된 RNA를 제거하기 위해 세척액(2-chloroacetamide 용액 20X)을 D.W로 희석하여 3회 세척하였다. 세척한 microplate에 형광검출액(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate 용액) 100 µl를 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 정지액(2.2% citric acid, 1.5% HCl, 1.5% sulfuric acid and 94.8% water) 100 µl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (\text{Activity}_{\text{control}} - \text{Activity}_{\text{sample}}) / \text{Activity}_{\text{control}} \times 100$$

5. HIV-1 protease 활성 억제

유전자 재조합으로 생산된 HIV-1 protease에 의해 기질의 cleavage를 HPLC로 측정하였고 효소원은 Kusumoto 등의 방법³⁾에 의해 준비하였다. 즉 HIV-1 protease (PR)의 DNA를 나타내는 JM 105 Escherichia coli 에서 생산된 HIV-1 protease를 ([50 mM NaOAc(pH 5.0), 1 mM EDTA-2Na, 2mM 2-Mercaptoethanol]:Glycerol)=75:25 용액에 희석하여 사용하였고, 기질은 oligopeptide[His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-(pNO₂-Phe)-Glu-Ala-Nle-Ser-NH₂ (M.W. 1315)]를 (주) 단백질 연구소(Osaka, Japan)로부터 구입하여 완충액 (50 mM NaOAc, pH 5.0)에 2 mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 항 HIV-1 protease 반응은 완충액 1 µl, 기질 1.0 µl, 식물추출물 1 µl, 효소용액 2 µl을 각각 가하여 전량 5 µl의 반응혼합물을 조제하고 37℃에서 1시간 반응시킨 후 90℃에서 60초간 가열하여 효소 반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 증류수 35 µl로 희석한 후 HPLC 분석을 행하였으며 HPLC 분석 조건으로 column은 LiChrospher 100 RP-18 (column size, 250 x 4 mm, Merck, Darmstadt, FRG)을, 용

매는 0.1% TFA와 acetonitrile(20%-50% gradient)로 하였으며, 유속은 1.0 ml/min로 하면서 UV 280 nm에서 분석하였다(Fig. 1).

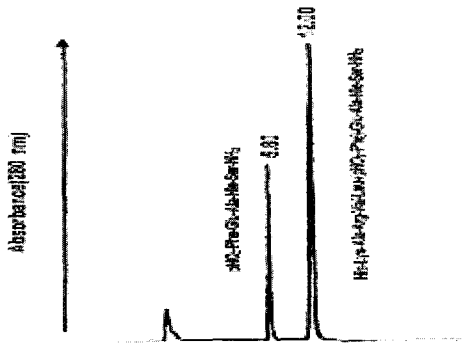


Fig. 1. HPLC profile of the reaction mixture of HIV-1 protease. The substrate and its hydrolysate were detected 280nm and their retention times were 12.00 and 5.80 min. respectively

6. α -glucosidase 억제 활성

α -glucosidase에 의해 p-nitrophenyl- α -D-glucoside의 cleavage를 spectrophotometer로 측정하는 방법을 이용하였다. 실험에 사용한 효소원은 *Saccharomyces sp.*에서 얻은 α -glucosidase(Toyobo Company, Osaka, Japan)를 완충액(10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 20% glycerol)에 0.5 U/ml가 되도록하여 사용하였으며, 기질은 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(Nacalai Tesque Inc., Osaka, Japan)를 평균 증류수에 10 mM이 되도록하여 사용하였다. 항 α -glucosidase 반응액의 조성은 50 μ l 완충액(100 mM Sodium phosphate, pH 7.0), 100 μ l 기질용액과 20 μ l 식물추출물로 하고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비배양한 후 30 μ l 효소를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 그리고 140 μ l 정지액(0.2 M sodium carbonate)으로 반응을 정지시킨 후 microplate well에 옮겨 405 nm에서 흡광도를 측정하였고 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (\text{Activity}_{\text{control}} - \text{Activity}_{\text{sample}}) / \text{Activity}_{\text{control}} \times 100$$

7. HIV-1 복제 억제

HIV-1 복제억제활성 실험은 Otake 등의 방법¹⁴⁾에 의해 행하여 졌다. 실험에 사용된 세포는 HTLV-1 에 감염된 MT-4 cell line으로 penicillin G 100 U/ml(Banyu Pharmaceutical, Tokyo, Japan)와 streptomycin 100 μ g/ml(Meiji Seika, Tokyo, Japan) 그리고 10% fetal calf serum(FCS, Flow Laboratories, North Ryde, Australia)이 제공되는 RPMI-1640배지(Flow Laboratories, Irvine, Scotland)에 5% CO₂와 37 $^{\circ}$ C를 유지하면서 실험에 사용하였다. 바이러스는 MOLT-4/HTLV-3IIIb 세포로부터 얻은 HIV-1 (strain HTLV-III_b)을 이용하였다. 항 HIV-1 활성은 MT-4 세포를 50%-tissue culture infective dose(TCID₅₀)에서 1시간 동안 HIV-1(HTLV-III_b)에 감염시켰다. 그리고 RPMI-1640배지에서 1 \times 10⁵ cells/ml로 재현탁시키고 현탁된 세포를 200 μ l/well씩 96-well culture plate에 식물엑스와 함께 처리하고 5일간 배양하였다. 식물엑스의 MT-4세포에 대한 HIV-1 유도 세포변성(CPE, cytopathic effect)을 완전히 억제하는 농도(IC, inhibitory concentration)를 광학현미

경으로 관찰하였으며 세포독성(CC, cytotoxic concentration)은 MT-4 세포의 생존력 감소로 측정하였다. 대조군은 HIV-1에 감염시킨 세포와 시키지 않은 세포에 식물엑스를 넣지 않고 측정하였다. 양성대조군은 AZT와 DS8000을 각각 이용하였다.

결과 및 고찰

에이즈(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)의 병인학적 원인 인 HIV-1(human immunodeficiency virus type I)은 RNA를 유전적 모태로 하는 레트로바이러스 있다^{15,16)}. HIV-1은 RNA를 숙주 세포에 삽입하고 reverse transcriptase (RT)¹⁷⁾에 의해 viral DNA로 전사되어 host chromosome에 proviral DNA 형태로 존재한다. 숙주세포에서 잠복기를 거쳐 protease(PR)¹⁸⁾, glucosidase(GL)등의 작용으로^{19,20)} mature virion으로 budding된다. 이렇듯 virus가 복제하는 과정에서 host cell을 파괴하므로써 인간의 면역기전에 심각한 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 천연물을 이용한 AIDS 치료약물 개발이 활성화되고 있으며 gossypol과 그 합성 유도체²⁾, 해양 천연 알카로이드인 pyrido[4,3,2-mn]thiazolo[5,4-b]acridine³⁾, tannin⁴⁾, flavonoid 등의 항 HIV-1 억제활성이 보고되었고, 또한 천연물엑스의 광범위한 screening이⁵⁾ 행해지고 있는 실정이다.

음나무 추출물의 HIV-1 억제활성을 검색한 결과 음나무 잎, 줄기의 MeOH 추출물은 역전사 효소 억제 활성이 낮거나 거의 없었으며, 음나무 줄기, 엽병의 물추출물 그리고 엽병의 메탄올 추출물은 100 μ g/ml 농도에서 각각 82.7%, 94.4%, 50.1%의 HIV 역전사 효소 억제 활성을 나타내었다(Fig. 1). 그리고 재조합 HIV-1프로테아제 억제활성 실험에서는 음나무 추출물중 엽병의 물추출물이 100 μ g/ml의 농도에서 58.9%로 나타나 가장 억제 활성이 높은 추출물임을 알 수 있었다(Fig. 2.)

음나무로부터 추출한 추출물 1, 2, 3 및 5는 글루코시다제 억제 활성을 나타내지 않았지만 줄기의 메탄올추출물 및 엽병의 메탄올추출물은 각각 23.9% 및 15.8%로 경미한 억제활성을 나타내었다. (Fig. 3) 음나무 추출물의 HIV-1 바이러스 증식(복제)을 완전히 억제하는 최소농도는 잎의 물추출물이 100 μ g/ml, 줄기의 물추출물이 50 μ g/ml, 엽병의 추출물이 25 μ g/ml, 엽병의 메탄올추출물 이 100 μ g/ml로 나타났다. 또한, 음나무 추출물을 처리하여 배양하였을 때 세포독성을 나타내는 최소농도는 추출물 1 내지 추출물 6 모두 100 μ g/ml 이상으로 나타나 세포독성을 거의 일으키지 않음을 알 수 있었다(Table 2) 이상의 결과로 보아 음나무의 엽병 물추출물이 높은 항 역전사효소 활성을 가짐과 동시에 바이러스의 복제억제에도 크게 기여하는 것을 알 수 있었으며 이는 음나무의 HIV-1 복제 억제활성이 역전사효소 억제와 상관관계가 있는 것으로 추정된다. 또한 엽병의 물추출물은 유전자 재조합 HIV-1 protease 억제활성에서도 높은 활성을 나타냄으로써 바이러스 복제억제에 일부 기여하는 것으로 추정된다. 반면 글루코시다제 억제활성에서는 유의한 활성을 보이지 않았다. 그리고 음나무의 줄기 물추출물도 역전사효소억제와 바이러스 복제억제에서 각각 높은 활성을 보이므로써 역전사효소 활

성억제가 HIV-1 바이러스 복제억제에 기여하고 있을 것으로 추정되었다. 특히 물추출물에서 효소억제나 바이러스 복제억제에 높은 활성을 나타내는 것은 식물 중 고분자 활성 물질인 tannin, polysaccharide, protein 등이 물 추출물에 다량 함유되어 있어 효소결합능력이 탁월하고, 바이러스 표면의 당단백에 결합이 용이하므로 강한 활성을 보이는 것으로 추정된다^{6,21,22}. 또한 음나무 엑스의 활성요인은 다양한 복합분자들이 분포되어 있어 효소 억제 작용, virus-cell 융합 억제^{23,24}, 감염된 세포로부터 virus분자의 방출 억제²⁵ 등에도 관여하는 것으로 생각되어진다. 음나무 추출물의 HIV-1활성에 관여하는 화합물 탐색을 위하여 active guided fractionation을 실시하고 있으며, 향후 NMR 등 분광학적 방법을 통해 활성화합물의 구조를 동정할 것이다.

Table 2. Inhibitory effects of extracts of some Korean edible and medicinal plants against HIV-1 viral replication

Sample No.	Botanical Name	Used Parts	Extracts	IC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)
1		leaf	W	100	>100
2		stem	M	NE	>100
3		leaf	W	50	>100
4		stem	M	NE	>100
5		aerial part	W	25	>100
6			M	100	>100
Positive control	AZT			0.00195	>1
	DS8000			0.97	>1000

W, water extract; M, methanol extract. Water extracts are dissolved in distilled water, methanol extracts are dissolved in DMSO or 10% DMSO in water. IC₅₀, the minimum concentration for complete inhibition of HIV-1 induced CPE(cytopathic effect) in MT-4 cells by microscopic observation. CC₅₀, the minimum concentration for appearance of MT-4 cell toxicity by microscopic observation. NE, not effective

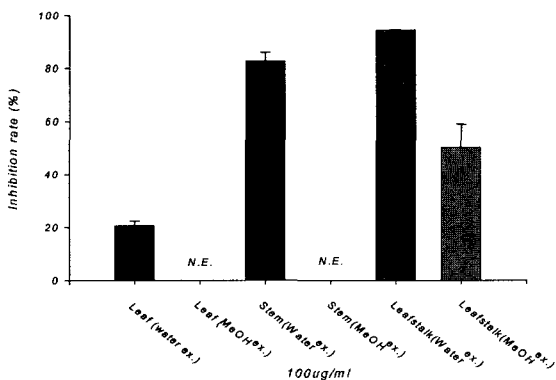


Fig. 2. Inhibition rates of Kalopanax pictus on HIV-1 reverse transcriptase

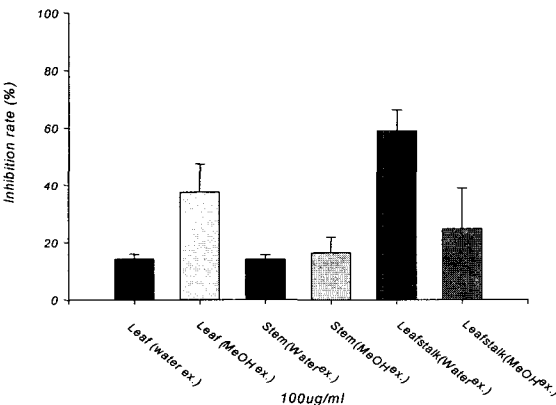


Fig. 3. Inhibition rates of Kalopanax pictus on HIV-1 protease

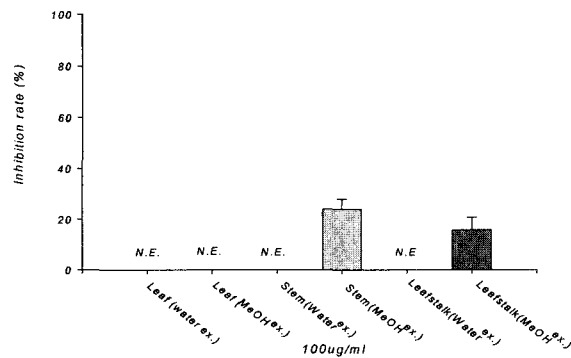


Fig. 4. Inhibition rates of Kalopanax pictus on alpha-glucosidase

결론

음나무 추출물을 이용한 HIV-1의 복제억제를 관련효소와 바이러스의 복제억제실험을 통하여 살펴보았다. 역전사효소억제 활성을 ELOSA 방법으로 실험한 결과 음나무 줄기, 엽병의 물추출물이 100 µg/ml 농도에서 각각 82.7%, 94.4%의 높은 활성을 나타내었고, 음나무 엽병의 물추출물이 58.9%의 HIV-1 protease 억제활성 나타 내었다. 그리고 항 HIV-1 복제억제활성은 MT-4 세포에 대한 HIV-1 유도 세포변성억제를 광학현미경으로 관찰하여 살펴본 결과 줄기의 물추출물이 50 µg/ml, 엽병의 추출물이 25 µg/ml 농도에서 HIV-1바이러스 증식을 완전히 억제하였다.

참고문헌

1. Yang, S. S., Cragg, G. M., Newman, D. J., Bader, J. P. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of Natural Products*. 64(2): 265-277. 2001.
2. 유영법, 박종철, 이종호, 김경업, 조성기, 변명우, Hirotsu Miyashiro, Masao Hattori. Human Immunodeficiency Virus Type 1에 대한 수종 식물 추출물의 억제활성 검색. *생약학회지*. 29(4): 338-346. 1998.
3. Taraporewala, I.B., Cessac, J.W., Chanh, T.C., Delgado, A.V. and Schinazi, R.F. HIV-1 neutralization and tumor cell proliferation inhibition in vitro by simplified analogues of pyrido[4,3,2-mn]thiazolo[5,4-b]acridine marine alkaloids. *Journal of Medicinal Chemistry*. 35(15): 2744-2752. 1992.
4. Nakashima, H., Murakami, T., Yamamoto, N., Sakagami, H., Tanuma, S., Hatano, T., Yoshida, T. and Okuda, T. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Research*. 18: 91-103. 1992.
5. Kusumoto, I.T., Nakabayashi, T., Kida, H., Miyashiro, H., Hattori, M., Namba T. and Shimotohno, K. Screening of various plant extracts used in ayurvedic medicine for

- inhibitory effects on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease. *Phytotherapy Research*. 9: 180-184. 1995.
6. 이창복. *대한식물도감*. 서울: 향문사. 572. 1993.
 7. 이경순, 김창민, 신민교, 안덕균. *완역중약대사전*. 서울: 도서출판정담. 4666. 1998.
 8. 홍성수, 황지상, 허재두, 노재섭, 이경순. *해동피로부터 Kalopanax - saponin B의 분리 및 함량분석*. *생약학회지*. 33(4):277-284, 2002.
 9. Jung, K.Y., Son, K.H. and Do, J.C. Flavonol glycosides from the leaves of *Kalopanax pictum*, *Korean Journal of Pharmacognosy*. 33(4): 277~284(2002). 1992.
 10. 홍성수, 한두일, 황방연, 최우희, 강호상, 이명구, 이동구, 이경순, 노재섭. *음나무 수피의 화학적성분*. *생약학회지*. 32(4): 302-306. 2001.
 11. 이은, 최무영, 박희준, 차배천, 조순현. *해동피의 화학성분 및 생리활성*. *생약학회지*. 26(2) 122-129. 1995.
 12. 전성주, 서화중. *해동피추출물이 실험적으로 유발된 가토의 간장기능장애에 미치는 영향*. *한국식품영양과학회지*. 18(3), 273-278. 1989.
 13. Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J. and Salemme, F.R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*. 243: 85-88. 1989.
 14. Otake, T., Mori, H., Morimoto, M., Ueba, N. and Kusumoto, I.T. Anti-human immunodeficiency virus activity of some tropical medicinal plants. *J. Traditional medicines*. 11: 188-193. 1994.
 15. Kaminchik, J., Margalit R., Yaish S., Drummer H., Amit B., Saver N., Gorecki M. and Panet A. Cellular distribution of HIV type I nef protein: Identification of domains in nef required for association with membrane and detergent-insoluble cellular matrix. *Aids Research and Human Retroviruses*. 10: 1003-1010. 1994.
 16. Peliska, J.A. and Benkovic, S. J. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 258: 1112-1118. 1992.
 17. Prasad, V.R. and Goff, S.P. Linker insertion mutagenesis of human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in bacteria: definition of the minimal polymerase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 3104-3108. 1989.
 18. Katz, R.A. and Skalka, A.M. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem*. 63: 133-173. 1994.
 19. Taylor, D.L., Kang, M.S., Brennan, T.M., Bridges, C.G., Sunkara, P.S. and Tyns, A.S. Inhibition of alpha-glucosidase I of the glycoprotein-processing enzymes by 6-O-butanoyl castanospermine (MDL 28,574) and its consequences in human immunodeficiency virus-infected T cells. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 38 (8): 1780-1787. 1994.
 20. Mohan, P. Anti-AIDS drug development: challenges and strategies. *Pharmaceutical Research*. 9 (6): 703-714. 1992.
 21. Kakiuchi, N., Hattori, M. and Namba T. Inhibitory effect of tannins on reverse transcriptase from RNA tumor virus. *Journal of Natural Products*. 48 (4): 614-621. 1985.
 22. Batinic, D. and Robey, R.A. The V3 region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 binds sulfated polysaccharides and CD4-derived synthetic peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 6664-6671. 1992.
 23. Balzar-n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral Res*. 18: 191-207. 1992.
 24. Mayaux, J.F., Bousseau, A., Pauwels, R., Huet, T., Henin, Y., Dereu, N., Evers, M., Soler, F., Poujade, C., De Clercq, E. and Le Pecq J.B. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 3564-3568. 1994.
 25. Rossmann, M.G. Antiviral agents targeted to interact with viral capsid proteins and a possible application to human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 4625-4627. 1988.