

진통 펩타이드 K7DA의 혈액-뇌 관문을 통한 Vector-Mediated Delivery

강영숙

숙명여자대학교 약학대학

Vector-Mediated Delivery of ¹²⁵I-labeled Opioid Peptide, [Lys⁷]dermorphin (K7DA), through the Blood-Brain Barrier

Young-Sook KANG

Collge of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

(Received February 20, 1997; accepted March 8, 1997)

Abstract - [Lys⁷]dermorphin, abbreviated K7DA, which has structural features similar to a metabolically stable μ -opioid peptide agonist [D-Arg², Lys⁴]dermorphin analogue (DALDA), but is intrinsically more potent with respect to binding to the μ -opioid peptide receptor. The present studies report on attempts to enhance brain uptake of systemically administered K7DA by conjugation to a complex of streptavidin (SA) and the OX26 murine monoclonal antibody to the rat transferrin receptor, which undergoes receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier (BBB). SA-OX26 conjugate mediates BBB transport of biotinylated therapeutics. The K7DA is monobiotinylated at the ϵ -amino group of the Lys⁷ residue with cleavable linker using NHS-SS-biotin. The brain uptake of ¹²⁵I-labeled biotinylated K7DA (¹²⁵I-bio-SS-K7DA) was very small and rapidly metabolized after intravenous injection. The brain uptake, expressed as percent of injected dose delivered per gram of brain, of the ¹²⁵I-bio-SS-K7DA bound to the SA-OX26 conjugate (¹²⁵I-bio-SS-K7DA/SA-OX26) was 0.14 ± 0.01 , a level that is 2-fold greater than the brain uptake of morphine. The cleavability of the disulfide linker in vivo in rat plasma and brain was assessed with gel filtration HPLC and intravenous injection of labeled opioid chimeric peptides. The disulfide linker is stable in plasma in vivo but is cleaved in rat brain in vivo. In conclusion, these studies show that delivery of these potential opioid peptides to the brain may be improved by coupling them to vector-mediated BBB drug delivery system.

Keywords □ brain drug delivery, opioid peptides, pharmacokinetics

수용체와의 결합친화성이 아주 높고 강력한 약리활성을 나타내는 진통펩타이드가 개발되었다고 하더라도 in vivo에서 전신적으로 투여시 혈액중의 효소에 의해 대사되어 약효를 소실하거나 대부분의 수용성 펩타이드에서 발견되는 특성인 뇌모세혈관 내피세포벽 즉 혈액-뇌 관문(blood-brain barrier, BBB)을 잘 통과하지 못하여 약리효과를 제대로 발휘할 수 없는 경우를 볼 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 이런 두가지 문제점을 해결하기 위하여 첫째, 이미 보고된 바와같이 대사적으로 안정한 dermorphin 유도체인 DALDA (Schiller 등, 1989)와 유사한 구조적 특성을 나타내며 μ -opioid 수용체에 강력하게 결합하는(Negri 등, 1992) [Lys⁷]dermorphin (K7DA)를 모델펩타이드로 선택하였고,

둘째 BBB투과성을 증진시키기 위하여 'chimeric peptides'의 송달시스템을(Pardridge, 1991) 도입하였다. 이것은 뇌에 수송되기 어려운 neuropeptide성 약제를 transport vector에 공유결합시켜 송달하는 방법이다. 즉, receptor-mediated transcytosis를 나타내는 rat transferrin receptor에 대한 단클론항체인 OX26를 모델vector로 사용하고 vector와 펩타이드의 결합을 용이하게 하도록 avidin-biotin technology (Yoshikawa와 Pardridge, 1992)를 이용하여 avidin-vector conjugates (SA-OX26)와 biotinylated peptide를 합성하여 in vivo로 투여하는 것이다. 이 경우 biotinylated peptide의 합성은 혈중에서 안정하고 뇌중에서 용이하게 biotin과 peptide의 결합이 절단되는 disulfide 연결방법을 이용하여 만든다.

본 연구는 in vivo로 투여된 K7DA와 chimeric peptides

* To whom correspondence should be addressed.

즉 bio-SS-K7DA/SA-OX26의 혈중 pharmacokinetics와 HPLC pattern을 비교분석하여 opioid peptide의 뇌중송달을 효과적으로 증진시키기 위하여 검토한 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료

Na¹²⁵I는 Amersham Korea로부터 공급받았고, [Lys⁷]dermorphin (K7DA)는 Dr. Bickel (Philipps University, Marburg, Germany)이 친절하게 제공하였다. OX26는 Dr. Bickel이 Dr. Pardridge (UCLA, USA)로부터 분양받아서 독일에서 제대배양하여 제공하였다. Sulfosuccinimidyl 2-(biotin-amidoethyl)-1,3'-dithiopropionate (NHS-SS-biotin), 2-iminothiolane (Traut's reagent)과 m-maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide ester (MBS)는 Pierce Chemical 제품을 사용하였다. Acetonitrile은 Fisher Scientific으로부터, chloramine T는 MCB Reagents, 또한 recombinant streptavidin (SA) 및 기타 시약은 Sigma의 제품을 구입하여 사용하였다. Vydac C4 (10×250 mm) reversed-phase HPLC column은 Separations Group (Hesperia, CA)에서, Superdex 200 HR 10/30은 Pharmacia로부터, TSK-gel G2000 SW_{XL} HPLC columns (7.8×300 mm)은 Tosohaas에서 구입하였다. 동물은 수컷 Sprague-Dawley (SD) rat의 체중 190-260 g의 것을 Harlan Winkelman (Borchen, Germany)로부터 구입하여 일정기간 사육한 후 사용하였다.

Avidin-OX26 Conjugates의 합성

Antitransferrin receptor monoclonal antibody인 OX26와 박테리아에서 분리하여 정제한 SA의 conjugate는 이미 보고된 논문(Pardridge 등, 1995a; Bickel 등, 1995)과 동일한 방법으로 제조하였다. 간략하게 서술하면, OX26와 Traut's reagent의 비는 1:5의 비로 thiol화 시키고 SA는 20배 molar ratio의 MBS로 활성화 시킨다. Thiol화된 OX26와 활성화된 SA는 혼합하여 투석시킨 후, SA-OX26 conjugate는 Superdex 200 HR 10/30 column을 사용하여 fast protein liquid chromatography (FPLC) system으로 SA-OX26 conjugate와 unconjugated SA 또는 고분자량 집합체 등을 각각 분리 정제한다. 제조한 SA-OX26 conjugate는 [³H]biotin과 결합시켜 이미 보고한 방법(Kang과 Pardridge, 1994)대로 정맥투여하여 brain delivery량을 측정하였다. 정맥투여 후 60분에서의 [³H]biotin/SA-OX26 conjugate의 uptake량은 0.17±0.01%ID/g이었고, BBB 투과면적 permeability surface area (PS) product는 1.29±0.20 μl/min/g, 혈장중 농도 곡선 하 면적(AUC)는 138±15%ID·min/ml로 태 논문(Saito 등, 1995)에서 보고한 값과 유사한 값을 나타내었다.

Dermorphin analogue의 Biotinylation

K7DA는 a-N-fmoc-Tyr¹의 NH₂기가 보호된 형태로 Peptide Synthesis Facility (UCLA)로부터 제공받아 고체형태의 합성과 정제는 이미 보고된 논문(Bickel 등, 1994)의 방법에 따라 NHS-SS-biotin을 이용하여 biotinylation하였다. 간단히 서술하면, 500 μg의 fmoc-K7DA (분자량; 1066)를 dimethyl sulfoxide 400 μl에 용해시켜 0.05 M NaHCO₃ 600 μl를 가하여 pH를 8.3으로 조정한다. 여기에 6배 molar ratio의 NHS-SS-biotin을 0.05 M NaHCO₃ 1 ml에 녹인 용액을 가하고 실온에서 60분간 반응시킨 후, 100 μl의 trifluoroacetic acid (TFA)와 500 μl의 acetonitrile (ACN)을 가하여 반응을 중지시킨다. Reversed-phase column (Vydac C4 column, 10×250 mm)을 연결하고 flow rate는 3 ml/min로 하여 gradient system (110B Solvent Delivery Module, Beckman)을 이용한 HPLC (Lamda-Max Model 481, Waters LC)로 정제하고 N-terminal fmoc group을 제거시킨 후, bio-SS-K7DA는 다시 HPLC로 정제한다. Desbiotinylated K7DA (desbio-K7DA)를 얻기 위해서는 in vitro상에서 50 mM dithiothreitol (DTT)을 50 mM phosphate buffer (pH 7.5)에 녹여 1시간 실온에서 반응시켜 HPLC로 정제한다.

Bio-SS-K7DA의 Radioiodination

2 μg (1.6 nmol)의 bio-SS-K7DA에 1 mCi의 Na¹²⁵I와 1.4 μg의 chloramine T를 넣어 라벨화 한다. 반응은 실온에서 60초 동안 반응시킨 후, 1.9 μg의 sodium metabisulfite를 가하여 반응을 중지시킨다. Radioiodinated bio-SS-K7DA (¹²⁵I-bio-SS-K7DA)에 1% TFA 1 ml를 가하여 산성화 시킨 후 미리 methanol 10 ml, 60% ACN/0.1% TFA 5 ml과 증류수 10 ml로 활성화시킨 C18 SepPak cartridge에 적용시켜 0.1% TFA 10 ml로 씻고 5 ml의 60% ACN/0.1% TFA로 용출시킨다. 분획하여 얻은 ¹²⁵I-bio-SS-K7DA 용액중의 ACN은 증발시켜 제거하고 0.05 M Na₂HPO₄ (pH=7.4)와 0.05% sodium azide를 넣어 4°C에서 보관한다. 최종 생성물의 비활성은 0.12 mCi/nmol이고 trichloroacetic acid (TCA) 침전율은 95% 이상이었다.

Pharmacokinetics와 Brain uptake

¹²⁵I-bio-SS-K7DA 단독 또는 SA-OX26와의 pharmacokinetics와 brain uptake는 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (2 mg/kg)을 복강내로 투여하여 마취시킨 흰쥐에 single intravenous injection technique (Rapoport 등, 1980)을 이용하여 검토하였다. 0.1%의 rat serum albumin (RSA)을 함유한 0.2 ml의 Ringer Hepes buffer (RHB)에 0 또는 30 μg의 SA-OX26와 10 μCi의 ¹²⁵I-bio-SS-K7DA를 넣은 용액을 대퇴정맥으로 투여하고 혈액 채취는 대퇴동맥에서 0.25, 1, 2, 5, 15, 30, 60분에 혈액 약 0.25 ml을 취하였다. 약액 투여 후 1시간에 단두하여 뇌를 취하여 무게를 재고 뇌중의 방사활성을 측정하였다. Pharmacokinetic parameter는 biexponential equation (Gibaldi와 Perrier, 1982)에 plasma TCA 침전

방사활성 data를 fitting시켜 얻었다. 혈장중 농도 곡선하 면적(AUC), steady-state에서의 분포 용적(V_{dss}), 혈장중 전신 clearance (CL), 평균체류시간(MRT)는 Gibaldi와 Perrier의 정의에 따라 A₁, A₂, k₁, k₂로 부터 구하였다. ¹²⁵I-bio-SS-K7DA의 뇌중 분포 용적(V_D)은 투여후 1시간에서의 뇌의 dpm/g을 같은 시간의 종말 혈장중의 dpm/μl로 나누어 얻어진 값이다. ¹²⁵I-bio-SS-K7DA의 brain uptake는 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\%ID/g_{0.1} = PS \times AUC_{0.1}$$

여기에서 %ID/g는 뇌 1g이 uptake한 투여량에 대한 비율이고 PS는 다음의 식에 의해서 구한 뇌의 투과면적이다.

$$PS = [V_D - V_0]C_p(T) / AUC_{0.1}$$

C_p(T)는 종말시간의 혈장중 농도이고 V₀는 이미 다른 논문에서 보고된 뇌중의 plasma volume을 나타낸다(Kang과 Pardridge, 1994).

SA-OX26에 결합한 ¹²⁵I-bio-SS-K7DA의 혈장중 대사 안정성은 gel filtration HPLC로 조사하였다. 정맥주사후 60분에 혈액을 채취하여 얻은 혈장 20 μl를 흰쥐 3마리에서 각각 취하여 혼합하고 이것을 PBST buffer (0.01 M Na₂HPO₄, pH=7.4/0.15 M NaCl/0.05% Tween 20) 250 μl로 희석하여 TSK-gel filtration HPLC column에 주입하였다. 뇌중의 ¹²⁵I-bio-SS-K7DA/SA-OX26의 확인은 정맥주사후 60분에 얻은 흰쥐 3마리의 대뇌반구를 Polytron homogenizer를 이용하여 뇌의 3배 volume의 PBST buffer로 균질화하고 20,000

g, 4°C에서 30분동안 원심분리하여 얻은 상등액을 TSK-gel filtration column에 주입하여 조사하였다.

Gel filtration HPLC

SA-OX26에 ¹²⁵I-bio-SS-K7DA의 avidin-biotin결합 및 disulfide bond의 안정성은 TSK-gel G2000 SW_{XL} HPLC columns (7.8×300 mm)을 사용한 gel filtration HPLC로 확인하였고 이때 isocratic elution은 PBST buffer를 사용하였으며 속도는 0.5 ml/min로 하였다. Column fractions의 용량은 0.5 ml이고 각각의 방사활성을 측정하였다. 또한 이 column의 void volume과 salt volume은 각각 6 ml과 11 ml 이었다.

결과 및 고찰

¹²⁵I-bio-SS-K7DA의 정맥내 투여

대뇌정맥으로 순시에 단독 투여한 ¹²⁵I-bio-SS-K7DA의 pharmacokinetics와 brain uptake는 투여후 60분까지를 평가하였다(Fig. 1). 이 peptide는 투여한 후 60분에 투여한 량의 95% 이상이 혈중으로부터 제거되었고 신속히 대사되어 혈장중 방사활성의 TCA침전율은 투여후 0.25분에 83%에서부터 60분에 22%까지 떨어졌다(Fig. 2). ¹²⁵I-bio-SS-K7DA는 distribution half-life가 0.73±0.08 min이고, elimination half-life는 27.0±0.2 min, 평균체류시간 (MRT)이 35.6±0.2 min으로 혈장 compartment로부터 제거되었다(Table I). 또한, steady-state에서의 분포 용적 (V_{dss})은 309±17 ml/kg으로 plasma volume인 71±3 ml/kg (Pardridge, 1994)보다 4배

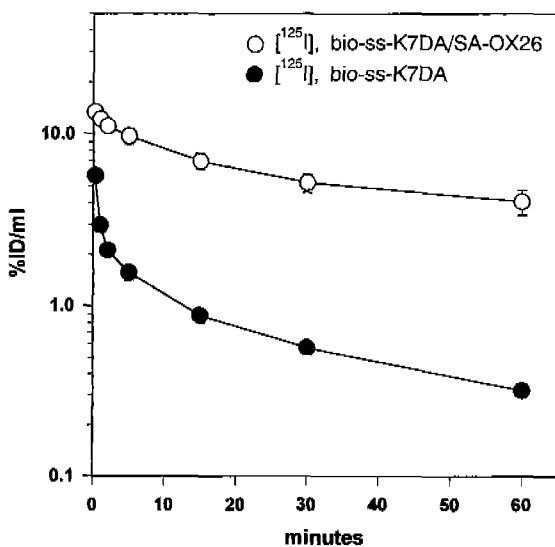


Fig. 1. Clearance from plasma of ¹²⁵I-bio-SS-K7DA in its free form (○) or bound to the SA-OX26 vector (●) is shown for up to 60 min after single intravenous injection. Data are mean±SE (n=3 rats); some SE bars are not visible because the SE is smaller than the symbol.

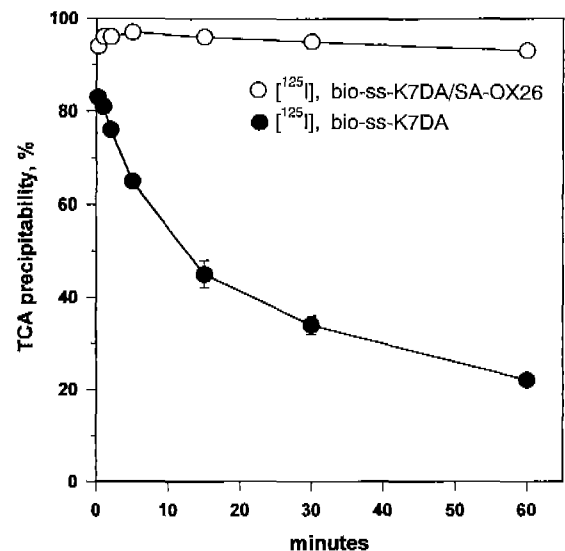


Fig. 2. The percent of plasma radioactivity that is precipitable with TCA is plotted as a function of time after intravenous administration for either the free (○) or conjugated ¹²⁵I-bio-SS-K7DA (●). Each point on the graph represents mean±SE (n=3 rats).

Table I. Pharmacokinetic parameters for [125 I]bio-SS-K7DA either free or conjugated to SA-OX26 in the rat

Parameter	[125 I]bio-SS-K7DA	[125 I]bio-SS-K7DA/ SA-OX26
A ₁ (%ID/ml)	5.05±0.29	6.61 ±0.63
A ₂ (%ID/ml)	1.38±0.10	6.57 ±0.41
k ₁ (min ⁻¹)	0.97±0.11	0.15 ±0.03
k ₂ (min ⁻¹)	0.026±0.001	0.0087±0.0024
t _{1/2β} (min)	0.73±0.08	5.38 ±1.21
distribution		
t _{1/2α} (min)	27.0±0.2	104 ± 38
elimination		
AUC _t (%ID · min/ml)	59.0±4.3	1038 ± 399
Vd _∞ (ml/kg)	309 ±17	69.0 ±1.5
CL _r (ml/min/kg)	8.71±0.50	0.61 ±0.17
MRT (min)	35.6±0.2	142 ± 53

All parameters are determined from TCA-corrected measurements of plasma radioactivity. Data are mean ± SE (n=3).

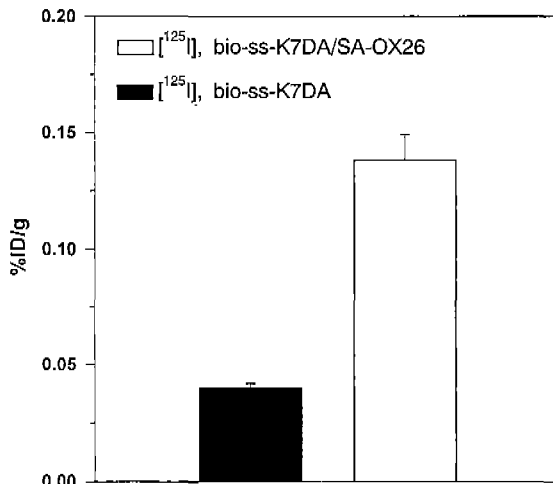


Fig. 3. The percent injective dose (%ID) delivered per gram of brain for either [125 I]bio-SS-K7DA or [125 I]bio-SS-K7DA/SA-OX26 at 60 min after intravenous injection. Results are mean ± SE (n=3 rats).

이상을 나타내고 있다. 혈장중 전신 clearance (CL)는 8.71 ± 0.50 ml/min/kg으로 대사적으로 안정한 dermorphin 유도체인 DALDA의 CL 10.8 ± 0.4 ml/min/kg보다 약간 낮은 수치를 나타내며 (Samii 등, 1994), 이 값은 sucrose의 값 10.4 ± 0.4 ml/min/kg (Samii 등, 1994)과 유사하므로 순환계로부터의 주요 제거경로는 glomerular filtration에 의한 것으로 생각된다. [125 I]bio-SS-K7DA의 brain uptake는 0.040 ± 0.002 %ID/g으로 DALDA의 brain uptake치 0.02 %ID/g의 2배값을 나타내었다 (Fig. 3). 이것은 K7DA의 대사적 안정성이 이 peptide의 전신 clearance를 제한하였고 따라서 혈장중 농도 곡선하 면적 (AUC)도 59 ± 4 %ID · min/ml로 DALDA의 AUC값 23 ± 1 %ID/min/ml의 2배 이상을 나타내었다

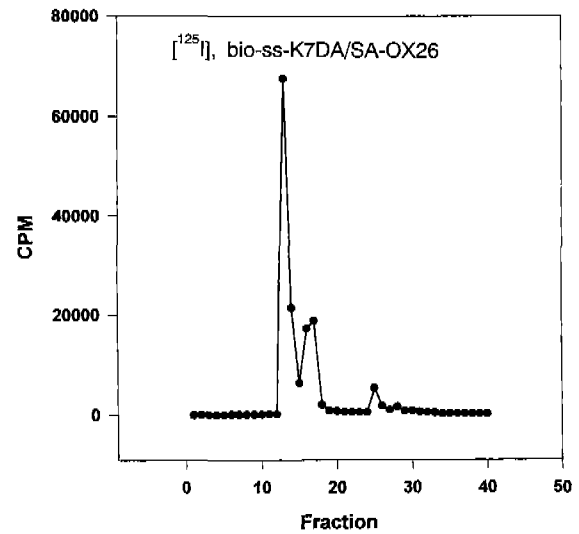


Fig. 4. Elution profile of gel filtration HPLC of [125 I]bio-SS-K7DA bound to the SA-OX26 vector before injection of tracer into rats. The column was eluted at 0.5 ml/min, and 0.5 ml fractions were collected and counted for [125 I]-radioactivity (CPM=counts per minute).

(Samii 등, 1994). [125 I]bio-SS-K7DA의 brain uptake의 값은 위의 식에서 보여주고 있는 것과 마찬가지로 AUC의 증가와 비례하여 uptake치의 상승을 나타내므로써 실험결과와 타당성을 제시하고 있다.

[125 I]bio-SS-K7DA/SA-OX26의 pharmacokinetics와 brain delivery

SA-OX26와 conjugation된 [125 I]bio-SS-K7DA ([125 I]bio-SS-K7DA/SA-OX26)는 TSK gel filtration HPLC column을 통하여 용출용적 7-9 ml에서 이동하였고 이것은 [3 H]biotin/SA-OX26의 용출용적과 동일하였다 (Fig. 4). [125 I]bio-SS-K7DA/SA-OX26의 대사속도와 혈장 clearance는 conjugation되지 않은 [125 I]bio-SS-K7DA와 비교하였다 (Fig. 1). Conjugation된 peptide의 혈장중의 대사적 안정성은 투여후 1시간에서 93 ± 1%라는 높은 TCA침전율을 보이므로써 증명되었다 (Fig. 2). [125 I]bio-SS-K7DA의 혈장중 전신 clearance는 SA-OX26 vector에 conjugation됨으로써 0.61 ± 0.17 ml/min/kg으로 93%가 감소되었다 (Table I). 투여후 1시간에서의 conjugation된 peptide의 AUC는 363 ± 43 %ID · min/ml이었고 혈액-뇌 관문 (BBB) 투과 면적 (PS) product는 0.388 ± 0.046 μl/min/g으로 이때 계산된 brain delivery의 값은 0.138 ± 0.011 %ID/g이었다 (Fig. 3). 이 값은 [125 I]bio-SS-K7DA의 brain uptake 3배 이상의 값을 나타내며 또한 진통활성을 나타내는 소분자물질인 morphine의 brain uptake의 2배 이상의 값을 보여주고 있는데 (Bickel 등, 1996; Oldendorf 등 1972), 결과적으로 이 peptide는 SA-OX26 vector와 conjugation을 형성하므로써 현저한 brain delivery의 상승

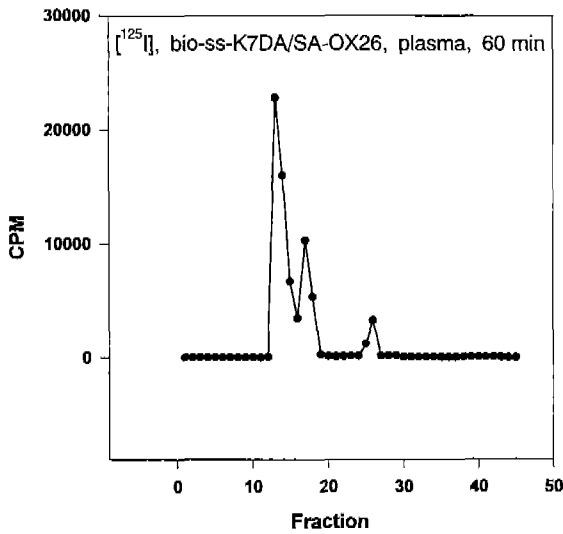


Fig. 5. Gel filtration HPLC chromatogram of plasma obtained 60 min after a single intravenous injection of ¹²⁵I-bio-SS-K7DA/SA-OX26. Elution of pooled plasma from three rats performed in triplicate. Fractions=0.5 ml.

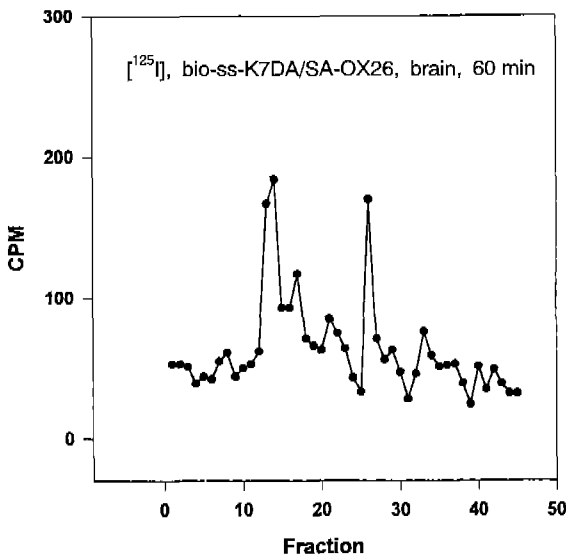


Fig. 6. Gel filtration HPLC chromatogram of brain homogenate obtained 60 min after intravenous injection of ¹²⁵I-bio-SS-K7DA bound to the SA-OX26 vector. Aliquots of brain homogenate were pooled from three rats performed in triplicate and injected onto the TSK-gel filtration column (7.8 × 300 mm). Fractions=0.5 ml.

을 초래하였다.

Chromatographic analysis

¹²⁵I-bio-SS-K7DA를 SA-OX26와 conjugation시켜 정맥내 주사한 후 혈중 및 brain endothelial cell중의 peptide와 SA-OX26 vector와의 disulfide결합의 안정성과 선택적 cleavage는 Fig. 5와 6에 각각 나타내었다. Fig. 5에 나타낸

바와 같이 정맥내 투여후 60분에서 얻어진 혈장중의 ¹²⁵I-bio-SS-K7DA는 HPLC gel filtration column으로부터 SA-OX26와 함께 용출용적 7-9 ml에서 90%이상이 용출되어 혈장중의 disulfide결합의 안정성의 결과는 이미 보고된 Bickel 등(1995)의 결과와 같은 결과를 보여주고 있다. 한편, 이 chimeric peptide를 정맥투여한 후 60분에서 흰쥐의 뇌추출물의 gel filtration HPLC분석은 radiolabeled chimeric peptide에서 free desbio-K7DA의 전환이 3:1의 비로 선택적인 cleavage를 나타내며 또한 peptide의 대사물의 peaks를 보이고 있다(Fig. 6). SA-OX26와 유사한 vector인 NLA-OX26와 다른 peptide와의 disulfide결합의 안정성을 검토한 보고에서는 disulfide결합이 in vitro 37°C에서 흰쥐의 뇌 homogenate에 의해 신속하게 파열되었다(Pardridge 등, 1990). 그러나 본 연구의 in vivo상태에서 radiolabeled chimeric peptide가 완전히 free desbio-K7DA로 전환되지 않은 것은 이 chimeric peptide가 microvessels의 endosomal compartment안에 머물러 있고 endothelial cytosol안으로 이동되고 있지 않으며, disulfide결합의 안정성을 그대로 유지하고 있음을 시사하고 있다.

결 론

진통 peptide인 K7DA를 biotinylation하여 여기에 avidin-biotin technology를 이용하여 avidin-vector conjugates (SA-OX26)와 결합시켜 합성한 chimeric peptide는 K7DA의 대사를 현저하게 감소시키는 효과와 이 peptide의 BBB 수송을 촉진시키는 두가지 효과를 나타내었다. 그러므로 이 delivery system은 peptide성 약물의 BBB 수송에 효율성을 제시하고 있으며, 본 연구에서 사용된 vector이외에도 최근에 보고된 활성 BBB 수송vector (Pardridge 등, 1995b)를 이용하여 brain delivery를 증진시켜 임상예의 적용 및 약리효과 등이 고려되어야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 신진연구 지원(과제번호 04-F-0063)과 1995년도 숙명여자대학교 교비연구비, 또한 독일 Alexander von Humboldt Foundation의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Bickel, U., Kang, Y. S. and Pardridge, W. M. (1995). In vivo cleavability of a disulfide-based chimeric opioid peptide in rat brain. *Bioconjugate Chem.* 6, 211-218.
 Bickel, U., Schumacher, O. P., Kang, Y. S. and Voigt, K. (1996). Poor permeability of morphine 3-glucuronide and

- morphine 6-glucuronide through the blood-brain barrier in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 107-113.
- Bickel, U., Yamada, S. and Pardridge, W. M. (1994). Synthesis and bioactivity of monobiotinylated DALDA: A μ -specific opioid peptide designed for targeted brain delivery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 791-796.
- Gibaldi, M. and Perrier, D. (1982). *Pharmacokinetics*. pp. 1-329 Marcel Dekker Press, New York.
- Kang, Y. S. and Pardridge, W. M. (1994). Use of neutral avidin improves pharmacokinetics and brain delivery of biotin bound to an avidin-monoclonal antibody conjugate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 344-350.
- Negri, L., Erspamer, G. F., Severini, C., Potenza, R. L., Melchiorri, P. and Erspamer, V. (1992). Dermorphin-related peptides from the skin of *Phyllomedusa bicolor* and their amidated analogs activate two μ opioid receptor subtypes that modulate antinociception and catalepsy in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7203-7207.
- Oldendorf, W. H., Hyman, S., Braun, L. and Oldendorf, S. Z. (1972). Blood-brain barrier. Penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science* **178**, 984-986.
- Pardridge, W. M. (1991). *Peptide Drug Delivery to the Brain*. pp. 1-357, Raven Press, New York.
- Pardridge, W. M., Boado, R. J. and Kang, Y. S. (1995). Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5592-5596.
- Pardridge, W. M., Kang, Y. S., Buciak, J. L. and Yang, J. (1995b). Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. *Pharm. Res.* **12**, 807-816.
- Pardridge, W. M., Kang, Y. S. and Buciak, J. L. (1994). Transport of human recombinant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier in vivo using vector-mediated peptide drug delivery. *Pharm. Res.* **11**, 738-746.
- Pardridge, W. M., Triguero, D. and Buciak, J. L. (1990). β -endorphin chimeric peptides: transport through the blood-brain barrier in vivo and cleavage of disulfide linkage by brain. *Endocrinology* **126**, 977-984.
- Rapoport, S. I., Klee, W. A., Pettigrew, K. D. and Ohno, K. (1980). Entry of opioid peptides into the central nervous system. *Science Wash. DC* **207**, 84-86.
- Saito, Y., Buciak, J., Yang, J. and Pardridge, W. M. (1995). Vector-mediated delivery of 125 I-labeled β -amyloid peptide $A\beta^{1-40}$ through the blood-brain barrier and binding to Alzheimer disease amyloid of the $A\beta^{1-40}$ /vector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10227-10231.
- Samii, A., Bickel, U., Stroth, U. and Pardridge, W. M. (1994). Blood-brain barrier transport of neuropeptides: analysis with a metabolically stable dermorphin analogue. *Am. J. Physiol.* **267**, E124-E131.
- Schiller, P. W., Nguyen, T. M. D., Chung, N. N. and Lemieux, C. (1989). Dermorphin analogues carrying an increased positive net charge in their "message" domain display extremely high μ -opioid receptor selectivity. *J. Med. Chem.* **32**, 698-703.
- Yoshikawa, T. and Pardridge, W. M. (1992). Biotin delivery to brain with a covalent conjugate of avidin and a monoclonal antibody to the transferrin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 897-903.