

## 화학적 및 유전공학적으로 제조한 뇌송달 벡터의 뇌수송량 비교

강영숙<sup>†</sup> · 서경희

숙명여자대학교 약학대학  
(1999년 2월 27일 접수)

### Comparison of Brain Uptakes for Brain Drug Delivery Vector Synthesized by Chemical and Genetical Engineering Method

Young-Sook Kang<sup>†</sup> and Kyung-Hee Seo

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

(Received February 27, 1999)

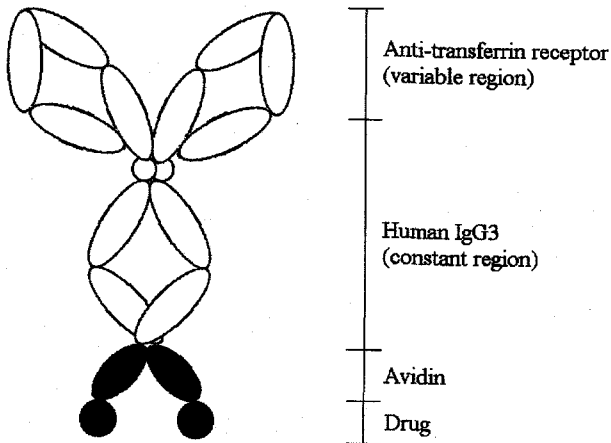
**ABSTRACT**—Drug delivery to the brain may be achieved by producing chimeric peptide, attaching the drug to protein “vectors” which are transported into the brain from the blood by a receptor-mediated transcytosis through the blood-brain barrier (BBB). Since the BBB expresses high concentrations of transferrin receptor, and it was reported that anti-transferrin receptor mouse monoclonal antibody (OX26) undergoes transcytosis through the BBB, it is logical to assume that a drug delivery system via transferrin receptor-mediated transcytosis is a promising strategy. In the present study, therefore, we tested feasibility of several OX26 based vectors for the brain delivery of a model drug. Avidin-based delivery vectors such as OX26-streptavidin (OX26-SA), OX26-neutralite avidin (OX26-NLA) were chemically synthesized vectors and OX26 immunoglobulin G 3 type C<sub>H3</sub> fusion avidin (OX26 IgG3C<sub>H3</sub>-AV) was genetically engineered. To improve the efficiency of producing chimeric peptide, we used avidin-biotin technology. Pharmacokinetics of [<sup>3</sup>H]biotin bound to OX26-SA, OX26-NLA and OX26 IgG3C<sub>H3</sub>-AV was determined by intravenous injection technique, and their stabilities in plasma were analyzed using HPLC. The brain delivery of [<sup>3</sup>H]biotin bound to OX26-SA, OX26-NLA and OX26 IgG3C<sub>H3</sub>-AV (expressed as %ID/g brain) was  $0.22 \pm 0.01$ ,  $0.18 \pm 0.01$  and  $0.25 \pm 0.09$ , respectively. The areas under the plasma concentration versus time curve (AUC) for OX26-SA, OX26-NLA, OX26 IgG3C<sub>H3</sub>-AV from time zero to 60 min were  $209 \pm 10$ ,  $195 \pm 9$ ,  $134 \pm 29$  %ID · min/ml, respectively and their total clearances (CL<sub>tot</sub>) were  $1.00 \pm 0.09$ ,  $1.08 \pm 0.07$  and  $1.54 \pm 0.29$  ml/min/kg, respectively. These results showed that these vectors possess preferable pharmaceutical (e.g., reasonable stability) and pharmacokinetics (e.g., significant brain uptake and enhanced AUC) for brain delivery. Therefore, these vectors may be broadly useful in the brain delivery of drugs that are not transported into the brain to a significant extent.

**Keywords**—Blood-brain barrier, Anti-transferrin receptor mouse monoclonal antibody, Avidin based delivery vectors, Fusion protein

다른 기관의 모세혈관과 달리 모든 척추동물의 뇌 모세혈관의 내피세포는 epithelial-like tight junction으로 결합되어<sup>1)</sup> 혈액중에 순환하는 물질의 세포막 투과에 대하여 매우 저항성이 큰 장벽을 형성한다.<sup>2,3)</sup> 따라서 뇌 이외의 기관에서는 pore 등을 통하여 각 기관의 실질세포내로 도달할 수 있었던 작은 분자들이나 펩타이드 또는 약물 등은 특별한 수송계가 존재하지 않는 한 뇌의 실질세포내로 도달하기 어렵다.<sup>4)</sup> 중추신경계의 질병을 진단하고 치료하기 위하여 약물을 중추로 송달하는 전략방법<sup>5)</sup> 중에서 뇌모세혈관 내피세포벽, 즉 혈액-뇌 관문(blood-brain barrier, BBB)을 손상시키지 않으면서 약리 효과를 발현시키는 생리학적 방법은 가장 이상적이라

하겠다. 이미 보고된 뇌로의 생리학적 약물송달 방법의 하나는 화학적으로 chimeric peptide를 만드는 것이다.<sup>6)</sup> Chimeric peptide를 이용한 약물송달 전략법은 분자량이 크거나 수용성이어서 보통의 방법으로는 BBB를 투과하지 못하는 약물을 BBB로 수송되는 벡터에 공유 결합시켜 뇌 송달을 촉진하는 방법이다.<sup>7)</sup> Chimeric peptide에 사용되는 BBB 수송 벡터는 absorptive-mediated 또는 receptor-mediated transcytosis를 하는 물질로 구분할 수 있는데<sup>8)</sup> 본 연구에서 벡터로 사용하려고 하는 murine monoclonal antibody(OX26)는 rat transferrin receptor에 결합하여 BBB를 receptor-mediated transcytosis 하는 물질이다.<sup>9,10)</sup> 약물을 chemical-based cross linker를 사용하여 BBB 수송 벡터에 결합시킬 때의 문제점은 생성되는 효율이 10~15%로 아주 낮다는 점이다.<sup>11,12)</sup> 그러나 이러한 문제점을 해결하기 위하여 avidin-biotin technology

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)710-9562, E-mail : yskang@sookmyung.ac.kr



Scheme I—Diagram of anti-transferrin receptor IgG3C<sub>H</sub>3-AV (fusion protein).

를 이용하므로써 상당히 향상시킬 수 있게 되었다.<sup>13,14)</sup> 본 연구에서 화학적으로 제조한 벡터와 비교하고자 하는 벡터는 계란의 흰자 성분인 avidin에 OX26를 유전공학적으로 융합시켜 만든 것이다. Human immunoglobulin G 3 type을 constant region으로 하여 C<sub>H</sub>3 위치의 종말의 중쇄에 avidin을 결합하고 OX26를 variable region에 유전자 재조합 방법으로 제조한 fusion protein이다(OX26 IgG3 C<sub>H</sub>3-AV) (Scheme 1).<sup>15)</sup>

본 실험에서는 화학적으로 제조한 OX26-streptavidin (OX26-SA), OX26-neutralite avidin(OX26-NLA) conjugate와 유전 공학적으로 제조한 OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV에 각각 [<sup>3</sup>H]biotin을 첨가하여 결합시킨 후 *in vivo*로 투여한 후에 intravenous injection technique와 internal carotid artery perfusion/capillary depletion method(ICAP/CDM)을 이용하여 뇌 수송량과 pharmacokinetics을 비교하고 HPLC를 이용해 각각의 뇌수송량의 혈중 안정성을 비교 분석하여 뇌질환 치료제의 효과적인 뇌수송도를 도모할 벡터에 관한 정보를 제공하고자 한다.

## 실험방법

### 시약및 기기

Anti-transferrin receptor monoclonal antibody(OX26)는 독일 Marburg 대학교 생리학 연구소의 U. Bickel 박사로부터 친절하게 제공되었고, 유전 공학적으로 제조한 human immunoglobulin G 3 type C<sub>H</sub>3 fusion avidin(OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV)은 한림대학교 부설 환경생명과학 연구소의 신승언 박사로부터 공급받았다. [<sup>3</sup>H]Biotin(58.2 Ci/mmol)은 Dupont NEN사에서 구입하였고, 방사성 동위원소 측정 카테일인 Ultima Gold와 Hionic Flour, 용해보조제 Soluene 350은 Packard사

로부터 구입하였다. Neutralite avidin(BLV0492C)은 Accurate Chemical and Scientific Co., streptavidin은 Sigma Chemical 사로부터, 2-iminothiolane(=Traut's reagent)과 maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinate ester(MBS), 단백질 측정시약인 bicinchonic acid는 Pierce Chemical사에서 구입하였다. Fast protein liquid chromatography(FPLC) system(Pharmacia LKB GP-20)에는 Superdex 200 HR 10/30 column(Pharmacia Biotech)을 사용하였고, HPLC system에는 TSK gel filtration column SW<sub>XL</sub> 3000(7.8×300 mm)을 Tosoh Corp.(이공교역)으로부터 구입하여 사용하였다. 이외의 모든 시약은 특급 혹은 일등급을 사용하였다.

### 화학적방법으로 벡터 OX26-Streptavidin(SA), OX26-Neutralite avidin (NLA)의 제조

Anti-transferrin receptor monoclonal antibody(OX26)와 streptavidin(SA),<sup>16,17)</sup> 또는 neutralite avidin(NLA)<sup>18)</sup>와의 conjugates는 이미 보고된 논문의 방법과 거의 유사한 방법에 따라 제조되었다. OX26는 traut's reagent(traut's reagent : OX26=10 : 1)로 thiolation하고 SA나 NLA는 MBS(MBS : SA or NLA=15 : 1)로 activation시킨다. Thiolated OX26와 activated SA 또는 activated NLA를 혼합한 후 투석막에 넣어 투석시킨 후 [<sup>3</sup>H]biotin 1 μCi를 농축액에 가하고 Superdex 200 HR 10/30 column을 이용하여 FPLC system에서 분리 정제한다. FPLC에서 elution된 각각의 fraction으로부터 β-counting용 pico vial tube에 50 μ씩 취하고 counting cocktail(Ultima gold, Packard) 5 ml를 가하여 방사활성을 측정하고 각각의 fraction의 흡광도를 측정한다.

### 화학적 및 유전공학적으로 제조된 벡터들의 Pharmacokinetics와 brain uptake

200~300 g의 SD계 수컷 흰쥐에 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine(2 mg/kg)을 근육주사하여 마취시킨 후 single intravenous injection technique<sup>18,19)</sup>을 사용하였다. 흰쥐 1마리당 [<sup>3</sup>H]biotin 5 μCi와 OX26-SA 또는 OX26-NLA 또는 OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-Av을 각각 20 μg 가하고, 0.1% rat serum albumin(RSA)를 함유한 Ringer Hepes buffer(RHB, pH 7.4)에 잘 혼합하여 200 μl를 취하여 대퇴 정맥으로 주입하였다. 주사후 0.25, 1, 2, 5, 15, 30, 60분에 대퇴 동맥으로부터 약 300 μl의 혈액을 취하고 sodium heparin 100 unit/ml이 함유된 동량의 생리 식염수로 혈액을 보충해 주었다. 약액 투여 후 60분에 혈액을 채취한 즉시 단두하여 brain, lung, heart, kidney, liver를 적출하여 용해보조제 soluene 350을 3 ml 가하고 60°C에서 30분간 반응시켜 용해시킨 후

Hionic Flour를 10 ml 가하여 각각의 방사활성을 측정하였다. Pharmacokinetic parameter는 plasma radio-activity data를 UCLA Health Science Computing Facilities에서 개발한 derivative-free nonlinear regression analysis (PARBMDP, Biomedical Computer P Series)를 이용하여 biexponential equation에 적용하여 계산하였다.

$$A(t) = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}$$

여기에서 A(t)는 plasma radioactivity의 %ID/ml이며 ID는 투여량이다.

Curve fitting시 data의 weight는 1/(concentration)<sup>2</sup>를 이용하였으며 여기에서 concentration=dpm/μl 또는 %ID/ml을 의미한다. 정맥 투여 60분 후의 각 장기중의 분포용적(V<sub>D</sub>)은 (조직 1 g 중의 dpm)/(종말시의 혈장 1 μl 중의 dpm)으로 계산되었다. Plasma clearance(CL), 혈장중 농도 대 시간 곡선하면적(area under the plasma concentration versus time curve, AUC) 등은 Gibaldi와 Perrier의 정의<sup>20)</sup>에 따라 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>로부터 구하였다.

$$CL = \frac{D}{AUC}$$

$$AUC = \frac{A_1}{k_1} + \frac{A_2}{k_2}$$

여기서 D는 투여량이다.

Brain에 있어서 각 물질의 BBB permeability-surface area (PS) product는 다른 장기에서의 organ clearance(μl/min/g)와 동일한 의미이며 다음과 같이 계산되었다.

$$PS = \frac{[V_D - V_0]C_p(T)}{\int_0^T C_p(t)dt}$$

C<sub>p</sub>(T)=종말의 혈장중 농도이고 V<sub>0</sub>=[<sup>14</sup>C]sucrose의 장기분포용적이며 V<sub>D</sub>=뇌분포용적이다.

정맥 투여 일정 시간 후에 brain이나 다른 장기로 약물이 delivery된 양은 %ID/g로 나타내어지며 다음과 같이 BBB permeability-surface area (PS) product와 plasma AUC로 나타내어진다.

$$\frac{\%ID}{g}(t) = PS \times AUC(t)$$

$$AUC(t) = \int_0^t C_p(t)dt$$

#### 벡터들의 HPLC 분석에 의한 혈중 안정성 평가

OX26-SA, OX26-NLA, OX26 IgG3C<sub>H3</sub>-AV에 결합한 [<sup>3</sup>H]biotin의 결합 및 disulfide bond의 안정성은 TSK-gel

G3000 SW<sub>XL</sub> HPLC column(7.8×300 mm)을 사용한 gel filtration HPLC로 확인하였고 이때 isocratic elution은 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20(phosphate buffer in saline with tween, PBST buffer, pH=7.4)를 사용하였으며 속도는 0.5 ml/min로 하였다. UV 280 nm로 검출하였으며, column fraction의 용량은 0.5 ml이고 각각의 fraction에 Ultima gold 5 ml를 넣어 방사활성을 측정하였다. 동물에 주사한 injectate 5 μl를 PBST buffer로 희석하여 100 μl가 되도록 하고 정맥주사후 60분에 혈액을 채취하여 얻은 혈장 일정량을 흰쥐 3마리에서 각각 취하여 혼합하고 이중 100 μl를 취하여 이것을 TSK gel filtration cloumn에 주입하여 비교하였다.

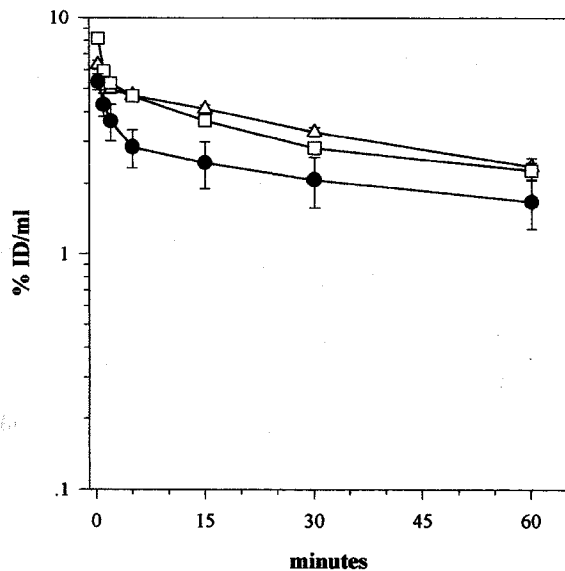
## 결과 및 고찰

### 벡터 OX26-SA, OX26-NLA의 화학적 제조

Thiolated OX26와 activated avidins의 reaction mixture를 분리 정제하기 위한 superdex 200 HR gel filtration column을 이용한 FPLC elution profiles은 이미 보고된 논문에서와 유사한 profiles을 보였으며<sup>16)</sup> FPLC로부터 용출시킨 fraction 중에 OX26-SA는 17-23(용출용적 9-12 ml), OX26-NLA는 16-22 fraction (용출용적 8-11 ml)을 취하였고 biconchonic acid를 사용하여 protein assay를 하였다. 이때 생성된 벡터의 생성효율은 약 40%를 나타내었다.

### 화학적 및 유전공학적으로 제조된 벡터들의 Pharmacokinetics와 brain uptake

논문에 보고된 방법에 따라 정맥 투여한 후<sup>18)</sup> [<sup>3</sup>H]biotin에 결합된 OX26-SA, OX26-NLA, OX26 IgG3C<sub>H3</sub>-AV의 [<sup>3</sup>H]biotin의 60분간의 혈장중 소실 양상을 Figure 1에 나타내었다. 이 결과에서 각 vector는 biexponential equation에 따라 소실됨을 알 수 있다. PARBMDP program을 이용하여 계산한 OX26-SA,<sup>17)</sup> OX26-NLA의<sup>18)</sup> pharmacokinetic parameters는 타 논문과 유사한 값을 나타내었다. Pharmacokinetic parameters, organ uptake를 각각 Table I, II에 나타내었다. 60분까지의 혈장중 농도 대 시간 곡선하면적(area under the plasma concentration versus time curve, AUC)은 각각 209±10, 195±9, 134±29 %ID·min/ml고, total clearance(CL<sub>tot</sub>)는 각각 1.00±0.09, 1.08±0.07, 1.54±0.29 ml/min/kg으로 이들 벡터중에 혈장중에서 [<sup>3</sup>H]biotin/OX26-SA가 가장 천천히 소실되었다. 각 벡터의 장기분포는 주로 간과 신장에 분포되었으며 특히 [<sup>3</sup>H]biotin/OX26 IgG3C<sub>H3</sub>-AV는 간에 많이 분포되고 있음을 알 수 있다.



**Figure 1**—The percentage injected dose per milliliter of plasma-time profile of [ $^3\text{H}$ ]biotin bound to different vectors, after intravenous injection of the injectate for up to 60 min. Key:  $\triangle$ ; OX26-SA,  $\square$ ; OX26-NLA,  $\bullet$ ; OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV. Data are mean  $\pm$  S.E.M. (n=3, rats).

**Table I**—Pharmacokinetic Parameters for [ $^3\text{H}$ ]OX26, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-SA, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-NLA, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV Following a Single IV Injection

Parameters	[ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-SA	[ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-NLA	[ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C <sub>H</sub> 3-AV
A <sub>1</sub> (%ID/ml)	1.87 $\pm$ 0.31	4.41 $\pm$ 0.51	2.91 $\pm$ 0.32
A <sub>2</sub> (%ID/ml)	4.92 $\pm$ 0.11	4.45 $\pm$ 0.16	2.75 $\pm$ 0.58
k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	1.13 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.20	0.58 $\pm$ 0.07
k <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.013 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.001	0.0087 $\pm$ 0.0005
t <sub>1/2</sub> (min)			
Distribution	0.63 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.25	1.24 $\pm$ 0.15
Elimination	55.9 $\pm$ 5.2	57.3 $\pm$ 2.8	80.6 $\pm$ 4.8
AUC <sub>0-60</sub> (%ID min/ml)	209 $\pm$ 10	195 $\pm$ 9	134 $\pm$ 29
AUC <sub>t</sub> (%ID min/ml)	400 $\pm$ 44	374 $\pm$ 30	332 $\pm$ 89
Vd <sub>tot</sub> (ml/kg)	79.0 $\pm$ 1.8	87.6 $\pm$ 1.6	172 $\pm$ 25
CL <sub>tot</sub> (ml/min/kg)	1.00 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.07	1.54 $\pm$ 0.29
MRT	80.3 $\pm$ 7.5	81.4 $\pm$ 4.1	114 $\pm$ 7

Measurements of plasma concentration was performed up to 60 min for [ $^3\text{H}$ ]OX26, [ $^3\text{H}$ ]biotin/OX26-SA, [ $^3\text{H}$ ]biotin/OX26-NLA, [ $^3\text{H}$ ]biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV

**Table II**—Organ Clearance and Uptake of [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-SA, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-NLA, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV

Organ	Organ clearance( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ )			Uptake (%ID/g)		
	OX26-SA	OX26-NLA	OX26 IgG3C <sub>H</sub> 3-AV	OX26-SA	OX26-NLA	OX26 IgG3C <sub>H</sub> 3-AV
Brain	1.04 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.07	2.25 $\pm$ 0.65	0.22 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.09
Lung	2.80 $\pm$ 0.29	6.20 $\pm$ 0.74	2.54 $\pm$ 0.78	0.58 $\pm$ 0.04	1.20 $\pm$ 0.11	0.30 $\pm$ 0.06
Heart	1.53 $\pm$ 0.22	3.11 $\pm$ 0.32	1.18 $\pm$ 0.49	0.32 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.05
Kidney	5.83 $\pm$ 0.09	6.81 $\pm$ 0.73	2.44 $\pm$ 0.69	1.22 $\pm$ 0.06	1.32 $\pm$ 0.10	0.37 $\pm$ 0.18
Liver	8.32 $\pm$ 0.08	11.4 $\pm$ 0.68	46.2 $\pm$ 12.8	1.74 $\pm$ 0.08	2.20 $\pm$ 0.07	5.60 $\pm$ 0.69

Data are mean  $\pm$  S.E.M. (n=3, rats). Measurements were made 60 min after intravenous injection.

**Table III**—The Brain Uptake Parameters of [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-SA, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-NLA, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV Following a Single IV Injection

Parameters	[ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-SA	[ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-NLA	[ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C <sub>H</sub> 3-AV
Brain V <sub>D</sub> ( $\mu\text{l}/\text{g}$ )	192 $\pm$ 55	103 $\pm$ 7	91.0 $\pm$ 8.0
PS( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{ml}$ )	1.04 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.07	2.25 $\pm$ 0.65
%ID/g	0.22 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.09

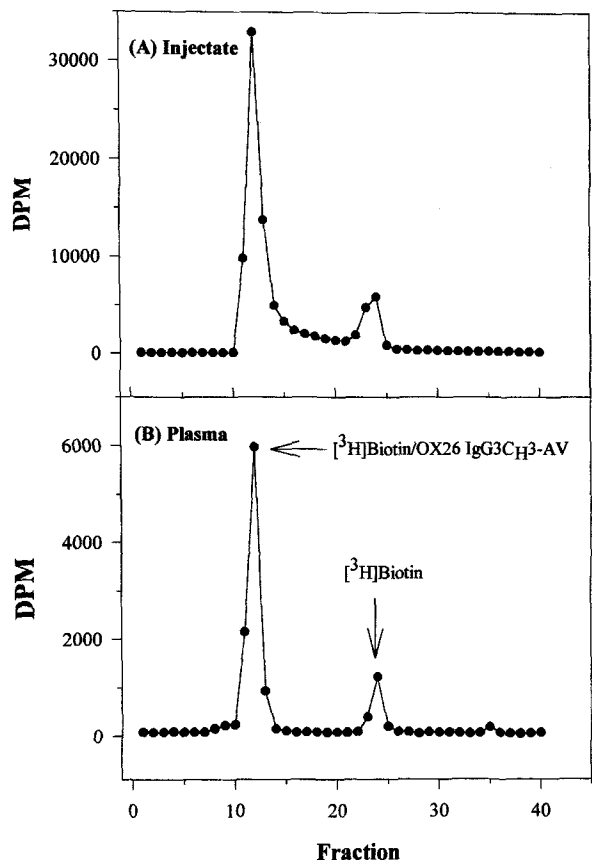
Data are mean  $\pm$  S.E.M (n=3, rats).

한편, [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26-SA, [ $^3\text{H}$ ]biotin/OX26-NLA, [ $^3\text{H}$ ]biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV의 brain uptake(% ID/g)은 각각 0.22  $\pm$  0.01, 0.18  $\pm$  0.01, 0.25  $\pm$  0.09로 brain uptake는 유전공학적으로 제조된 [ $^3\text{H}$ ]biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV가 가장 큰 값을 나타내었으나 유의한 차이는 없었다(Table III). 여기서 나타내는 brain uptake의 값이 어떤 의미를 갖고 있는지 진통제로 쓰이면서 저분자량인 [ $^3\text{H}$ ]morphine<sup>21</sup>(0.08  $\pm$  0.01)과 비교해 보면 2.5-3배, 펩타이드성 물질인 [Lys7]deomorphin(K7DA)의 9-13배로<sup>22</sup> 이들 벡터들의 brain uptake의 값은 수용성이면서 고분자량인 물질로서는 상당히 큰 값을 나타낼 수 있다. 또한 [ $^3\text{H}$ ]biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV가 혈액-뇌 관문을 투과하여 뇌실질세포내로 들어가는지를 *in vivo* internal carotid artery perfusion/capillary depletion technique을 이용하여 측정하였다. [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 을 0.1% bovine serum albumin(BSA)를 함유하는 Krebs-Henseleit buffer(KHB)를 사용하여 1.25 ml/min로 10 분간 뇌로 관류하였을 때의 뇌분포용적(V<sub>D</sub>,  $\mu\text{l}/\text{g}$ )은 Table IV에 나타내었다. Homogenate V<sub>D</sub>는 52.7  $\pm$  7.9, postvascular

**Table IV**—Brain Volume of Distribution (V<sub>D</sub>) of [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV after 10 min Internal Carotid Artery Perfusion Followed by Capillary Depletion Method of Brain Homogenate

Fraction	V <sub>D</sub> ( $\mu\text{l}/\text{g}$ )
Homogenate	52.7 $\pm$ 7.9
Postvascular supernatant	46.0 $\pm$ 7.2
Vascular pellet	1.65 $\pm$ 1.0

Data are mean  $\pm$  S.E.M (n=3, rats). [ $^3\text{H}$ ]Biotin/OX26 IgG3C<sub>H</sub>3-AV was perfused at concentration of 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ .



**Figure 2**—TSK-gel column SW<sub>XI</sub>3000 HPLC of injectate and plasma at 280 nm. The column was eluted at 0.5 ml/min. (A) Disintegration per minutes (DPM) of OX26 IgG<sub>3</sub>C<sub>H3</sub>-AV injectate fractions. Fraction was 0.5 ml. (B) DPM of OX26 IgG<sub>3</sub>C<sub>H3</sub>-AV plasma obtained 60 min after IV injection. Fraction size was 0.5 ml.

supernatant  $V_D$ 는  $46.0 \pm 7.2$ 로 약 87%가 postvascular supernatant 즉 뇌 실질세포내로 수송되고 있음을 알 수 있다.

**혈중 안정성 평가**

Injectate를 PBST buffer에 희석한 시료와 정맥 내 투여 후 60분에서 얻어진 혈장 시료 100  $\mu$ l를 HPLC에 loading 하고 PBST buffer로 column fraction을 0.5 ml/min으로 했을 때 6-7분에서 injectate에서 나타낸 peak와 동일한 peak가 60분 후의 혈장시료에서 나타났다. 따라서 OX26-SA, OX26-NLA, OX26 IgG<sub>3</sub>C<sub>H3</sub>-AV는 혈장 중에서 적어도 60분간은 안정하다는 것을 알 수 있다. [<sup>3</sup>H]Biotin/OX26-SA,<sup>17)</sup> [<sup>3</sup>H]biotin/OX26-NLA의 peak는<sup>23)</sup> 이미 보고된 논문에서의 결과와 유사하였고 [<sup>3</sup>H]biotin/OX26 IgG<sub>3</sub>C<sub>H3</sub>-AV의 injectate와 60분 후 혈장의 elution profile을 Figure 2에 나타내었다.

**결 론**

이상에서의 결과와 같이 화학적 및 유전 공학적으로 제조한 뇌송달 벡터는 모두 유의한 brain uptake를 나타내며 AUC를 증가시키므로 뇌송달효과가 크고 이들 벡터들이 혈장 중에서 적어도 60분간 이상은 안정함을 알 수 있다. 따라서 이들 벡터들은 뇌투과가 어려운 약물들을 biotinylation하여 순환계통에서 뇌조직으로 송달을 가능하게 하는 효과적인 벡터로서의 유용성이 기대된다.

**감사의 말씀**

이 논문은 한국과학재단 98핵심전문연구 지원(981-0717-132-2)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**문 헌**

1. M.W. Brightman, Morphology of blood-brain interfaces, *Exp. Eye Res.*, **25**, 1-25 (1977).
2. C. Crone and S.P. Olesen, Electrical resistance of brain microvascular endothelium, *Brain Res.*, **241**, 49-55 (1982).
3. W.H. Oldendorf, Permeability of the blood-brain barrier in the nervous system, D. B. Tower(Ed.), Raven press, New York, pp. 279-289 (1975).
4. W.M. Pardridge, Neuropeptides and the blood-brain barrier, *Ann. Rev. Physiol.*, **45**, 73-82 (1983).
5. W.M. Pardridge, *Peptide Drug Delivery to the Brain*, Raven Press, New York, pp. 1-357 (1991).
6. W.M. Pardridge, Recent advances in blood-brain barrier transport, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **28**, 25-39 (1988).
7. W.M. Pardridge, Y.S. Kang and J.L. Buciak, Transport of human recombinant brain-derived neurotropic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier *in vivo* using vector-mediated peptide drug delivery, *Pharm. Res.*, **11**, 738-746 (1994).
8. R.D. Broadwell, B.J. Balin and M. Salzman, Transcytotic pathway for blood-borne protein through the blood-brain barrier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 632-636 (1988).
9. P.M. Friden, L.R. Walus, G.F. Musso, M.A. Taylor, B. Malfroy and R. M. Starzyk, Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 4771-4775 (1991).
10. W.M. Pardridge, J.L. Buciak and P.M. Friden, Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier *in vivo*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 66-70 (1991).
11. W.M. Pardridge, Vector-mediated peptide drug delivery to the brain, *Adv. Drug Del. Rev.*, **15**, 109-146 (1995).
12. A.K. Kumagai, J.B. Eisenberg and W.M. Pardridge,

- Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a  $\beta$ -endorphin cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15214-15219 (1987).
13. W.M. Pardridge and R.J. Boado, Enhanced cellular uptake of biotinylated antisense oligonucleotide or peptide mediated by avidin, a cationic protein, *FEBS Lett.*, **288**, 30-32 (1991).
  14. T. Yoshikawa and W.M. Pardridge, 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 (1992).
  15. S.L. Morrison and S.U. Shin, Genetically engineered antibodies and their application to brain delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, **15**, 147-175 (1995).
  16. W.M. Pardridge, R.J. Boado and Y.S. Kang, Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier *in vivo*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 5592-5596 (1995).
  17. Y. Saito, J. Buciak, J. Yang and W.M. Pardridge, Vector-mediated delivery of 125I-labeled  $\beta$ -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 (1995).
  18. Y.S. Kang and W.M. Pardridge, 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 (1994).
  19. A. Samii, U. Bickel, U. Stroth and W.M. Pardridge, Blood-Brain Barrier transport of neuropeptides : analysis with a metabolically stable dermorphin analogue, *Am. J. Physiol.*, **267**, E124-E131 (1994).
  20. M. Gibaldi and D. Perrier, *Pharmacokinetics*, Marcel Dekker Inc., New York (1982).
  21. D. Wu, Y.S. Kang, U. Bickel and W.M. Pardridge, Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine, *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 768-771 (1997).
  22. Y.S. Kang, Vector-mediated delivery of 125I-labeled opioid peptide, [Lys7]demorphin (K7DA), through the blood-brain barrier, *J. Appl. Pharmacol.*, **5**, 53-58 (1997).
  23. U. Bickel, Y.S. Kang and W.M. Pardridge, *In vivo* cleavability of a disulfide-based chimeric opioid peptide in rat brain, *Bioconj. Chem.*, **6**, 211-218 (1995).