

## 마우스에서 뇌관류법과 정맥투여법에 의하여 흰쥐 트랜스페린 단일항체의 체내동태 및 혈액-뇌 관문 투과성의 검토

강영숙\*

숙명여자대학교 약학대학

### The Determination of Blood-Brain Barrier Permeability and Pharmacokinetics of a Rat Transferrin Receptor Monoclonal Antibody by Brain Perfusion Method and Intravenous Injection Technique in Mice

Young-Sook KANG\*

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

(Received February 25, 2002 ; accepted March 20, 2002)

**Abstract** – Brain drug targeting through the blood-brain barrier (BBB) *in vivo* is possible with peptidomimetic monoclonal antibodies that undergo receptor-mediated transcytosis through the BBB. Monoclonal antibody to the rat transferrin receptor, such as the OX26 was studied in rats as a transport vector through BBB on the transferrin receptor. But, OX26 is not an effective brain delivery vector in mouse. In the present studies, rat monoclonal antibody, 8D3 to the mouse transferrin receptor were evaluated for brain drug targeting vector in transgenic mouse model. Pharmacokinetic parameters in plasma and organ uptakes were determined at various times after i.v. bolus injection of [<sup>125</sup>I]8D3 in Balb/c mice. Brain uptake of [<sup>125</sup>I]8D3 was also studied with an internal carotid artery perfusion/capillary depletion method. After i.v. injection of [<sup>125</sup>I]8D3, plasma concentrations declined biexponentially with elimination half life of approximately 2.2 hours. Brain uptake of [<sup>125</sup>I]8D3 was 0.50 ± 0.09 percent of injected dose per g brain after 2 hours i.v. injection. After perfusion 5 min the apparent volume of distribution of [<sup>125</sup>I]8D3 in brain was 22.3 μl/g, which was 4.8 fold higher than the intravascular volume. These studies indicate rat monoclonal antibody to the mouse transferrin receptor, 8D3 may be used for brain drug targeting vector in mice.

**Key words** □ brain uptakes, brain drug targeting vector, mouse transferrin receptor monoclonal antibody

중추활성을 나타내는 펩타이드 또는 수용성 단백질의 혈액-뇌 관문 (blood-brain barrier, BBB)을 통한 뇌로의 수송에 대해서는 주로 transferrin 또는 insulin monoclonal antibody (mAb)를 수송벡터로 사용할 수 있는 가능성이 연구되어 이들 물질의 뇌로의 수송이 확인되었고 (Kang과 Pardridge, 1994; Pardridge 등, 1995), 진통 펩타이드, 신경유래 펩타이드 또는 oligodeoxynucleotide 등의 뇌중 수송을 이들 수송벡터를 이용하여 receptor-mediated transcytosis에 의하여 성공적으로 시도한 결과가 보고되었다 (Bickel 등, 1993; Pardridge 등, 1994; Kang 등, 1995; Wu 등, 1997). 그런데 이들 BBB 수송벡터는 일반적으로 중 특이성을 나타내고 있다. 흰쥐의 transferrin receptor (TfR)에 대한 murine antibody인 OX26 mAb가 발견되어

(Jefferies 등, 1985) immunohistochemistry 방법을 이용한 실험에서 흰쥐의 brain capillary endothelium에 TfR의 존재를 확인하였지만, 마우스에서도 활성이 있는지는 증명되지 않았다. 또한 anti-human insulin receptor mAb는 사람이나 영장류에는 특이성을 나타내지만 마우스에는 사용할 수 없다고 보고되었다 (Pardridge 등, 1995). 그런데, polyoma middle T oncogene-transformed endothelioma 세포주로 면역화시킨 Lewis 흰쥐에 의해 생성된 새로운 anti-TfR mAb, 8D3이 개발되어 마우스의 중추신경계에서 BBB를 구성하는 혈관에 친화성을 나타내고 choroid plexus 와 그 주위기관에는 염색되지 않으며 lymphocytes에서 철의 수송을 방해하지 않는다는 것이 *in vitro*에서 증명되었다 (Kissel 등, 1998). 그러나, 질병의 병인을 조사하기 위하여 transgenic mouse model (Jaenisch, 1988)이 개발되고 있지만, 마우스의 뇌로 약물을 수송시키기 위하여 몇가지 항

\*To whom correspondence should be addressed.

체를 intravenous injection technique (Pardridge 등, 1996; Pardridge 등, 1995)을 이용하여 비교한 연구보고를 (Lee 등, 2000) 제외하고는 소동물인 마우스에서 물질의 BBB수송을 평가한 *in vivo* 방법 (Kang과 Kim, 2000)은 소수에 불과하다. 그래서 저자는 *in vitro* 마우스의 뇌에서 증명된 anti-TfR mAb 8D3의 *in vivo* 마우스에서 생체내 동태와 뇌의 수송을 혈관내 용적 표지자를 동시에 투여하여 intravenous injection technique과 internal carotid artery perfusion method (Kang과 Kim, 2000; Takasato 등, 1984; Smith, 1996)로 정확히 평가하여 마우스에서 약물의 뇌수송을 위한 벡터로서의 사용이 가능한 지를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용한 anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibody 8D3은 독일의 Dr. B. Engelhardt (W.G. Kerckhoff Institut, Bad Nauheim)와 Dr. U. Bickel (Philipps Univ., Marburg)에 의하여 친절하게 제공되었고,  $^{125}\text{I-Na}$  (1 mCi/10  $\mu\text{l}$ )와  $^3\text{H}]\text{NSP}$  (100 Ci/mmol)는 Amersham Co. (Arlington Heights, IL)에서 구입하였고 iodogen은 Pierce Chemical Co. (Rockville, IL)의 제품을 사용하였으며 rat serum albumin (RSA, fraction V), bovine serum albumin (BSA, fraction V)과 기타 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

실험동물은 체중 20-25 g의 Balb/c 마우스를 Harlan Winkelmann (Borchen, Germany)에서 구입하여 일정기간 사육한 후 사용하였다.

### $^3\text{H}]\text{RSA}$ 와 $^{125}\text{I}]\text{8D3}$ 의 Radiolabel화

혈액 뇌 관문의 혈관내 용적 표지자로서 사용하기 위하여 RSA를 이미 보고한 방법 (Kang과 Kim, 1999)과 마찬가지로  $^3\text{H}]\text{NSP}$ 로 라벨화하여 Sephadex G-25 column으로 정제한 후 TCA 침전법으로 확인하여 99% 이상을 나타내는 것을 사용하였다. 한편, 8D3의 요오드 라벨화는 chromamine-T 방법 (Kang, 1997)을 사용하지 않고 온화하게 라벨화하기 위하여 iodogen을 사용하여 라벨화하였다. 보충하여 설명하면, 1.5 ml eppendorf tube에 dichloromethane에 iodogen을 녹인 용액 (2 mg/ml) 20  $\mu\text{l}$ 를 넣어 알루미늄호일로 차광해 놓고 여기에  $^{125}\text{I-Na}$  1 mCi (10  $\mu\text{l}$ )와 phosphate buffer와 8D3 20  $\mu\text{g}$ 을 넣어 5분간 실온에서 반응시킨다. 1% KI 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 넣어 반응을 멈추게 한 다음 0.1% BSA를 함유한 Ringer's-HEPES buffer (RHB, pH 7.4; 10 mM HEPES, 14 mM NaCl, 4 mM KCl,

2.8 mM  $\text{CaCl}_2$ )를 넣어 섞은 후 Sephadex G-25 column을 통하여 free iodine을 제거시킨 후 TCA 침전법으로 확인하여 95% 이상을 나타내는 것을 사용하였다.

### Intravenous injection technique법

이미 보고한 논문의 방법 (Pardridge 등, 1996; Pardridge 등, 1995)과 마찬가지로 25~30 g의 웅성 마우스에 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (2 mg/kg)을 근육주사하여 마취시킨 후 경동맥에 PE-10관을 삽입하였다. 혈관내 용적 표지자인  $^3\text{H}]\text{RSA}$  (16  $\mu\text{Ci}$ /마우스)과  $^{125}\text{I}]\text{8D3}$  (2  $\mu\text{Ci}$ /마우스)를 0.1% BSA를 함유한 RHB에 혼합하여 조제한 액 50  $\mu\text{l}$ 를 주사기에 넣어 경동맥으로 주입하였다. 경동맥으로부터 0.25, 1, 2, 5, 15, 30, 60, 120, 360분에 혈액을 취한 후 원심분리하여 혈장을 얻어서 일부는  $\gamma$ -counter (Packard Co.)로  $^{125}\text{I}$ 의 방사활성을 측정하고 일부는 soluen-350 3 ml를 가하여 용해시킨 후 hionic fluor 10 ml를 가하여 혼합한 후  $^3\text{H}$ 의 방사활성을  $\beta$ -counter (Beckman Co.)로 측정하였다.

약액을 투여한 후 각각 15, 60, 120, 360분에 즉시 단두하여 뇌, 폐, 신장, 간, 비장 및 심장을 적출하여 수술가위를 이용하여 균질화 시킨 후, 각 조직 약 100 mg을 취하여 칭량하고 각 조직의  $^{125}\text{I}$ 의 방사성활성을 측정하였다. 또 혈관내 용적을 보정하기 위하여 soluen-350 3 ml를 가하여 60°C, 30분 동안 가열하여 용해시킨 후 hionic fluor 10 ml를 넣어 각 조직중의  $^3\text{H}$ 의 방사활성을 측정하였다.

### Pharmacokinetic parameters와 brain uptakes

Pharmacokinetic parameter는 plasma radioactivity data를 UCLA Health Science Computing Facilities에서 개발한 derivative-free nonlinear regression analysis (PARBMDP, Biomedical Compute P Series)를 이용하여 biexponential equation에 적용하여 Gibaldi와 Perrier (1982)의 정의에 따라 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.

Data는  $\text{weight} = 1/(\text{concentration})^2$ 를 이용하였으며 여기에서 concentration은 %ID/ml을 의미한다. Plasma clearance (CL), steady-state에서의 apparent volume of distribution ( $V_{\text{dss}}$ ), 혈장중 농도-시간 곡선하면적 (area under the plasma concentration-time curve, AUC)과 평균체류시간 (mean residence time, MRT)은  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ 로부터 구하였다 (Kang 등, 1995; Kang과 Pardridge, 1994)

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

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

여기서 D는 투여량 (dose)이다.

Brain에 있어서 각 물질의 BBB permeability-surface area product (PS)는 다른 장기에서의 organ clearance rate,  $K_1$  ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ )와 동일한 의미이며 다음과 같이 계산되었다 (Pardridge 등, 1995).

$$PS \text{ 또는 } K_1 = \frac{[V_D - V_0]C_p(T)}{\int_0^T C_p(t)dt}$$

$C_p(T)$  = 종말기의 혈장중 농도

$V_0$  = 혈관내용적 표지자인 [ $^3\text{H}$ ]RSA의 장기분포용적

$V_D$  = 뇌 또는 각 장기에서의 물질의 분포용적

정맥 투여 일정 시간 후에 뇌 또는 다른 장기로 약물이 송달된 양은 %ID/g으로 나타내어지며 다음과 같이 PS와 plasma AUC로 나타내어진다 (Pardridge 등, 1995).

$$\frac{\%ID}{g}(t) = PS \text{ 또는 } K_1 \times AUC(t)$$

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

$$= \frac{A_1(1 - e^{-k_1 t})}{k_1} + \frac{A_2(1 - e^{-k_2 t})}{k_2}$$

여기서  $K_1$ 는 표지된 약물이 혈액으로부터 조직으로 unidirectional influx가 일어난 다음, 조직으로부터 혈액으로의 efflux가 일어난 정도를 나타내는 것으로 organ uptake는 주사후에 일정 시간에서의 %ID/g로 나타내어진다.

**Internal carotid artery perfusion method (ICAP)/capillary depletion method (CDM)**

마취시킨 20-30 g의 웅성 마우스의 목부위를 절개하여 흰쥐에서 이루어져 보고한 논문의 방법 (Kang과 Kim, 2000; Takasato 등, 1984)과 마찬가지로 혈관들을 분리하고 확대경을 통해서 분리된 혈관 등을 전기핀셋을 사용하여 절찰하였다. 오른쪽 외경동맥에 PE-10관을 삽입하여 infusion pump에 연결하고 수술하는 동안에는 thermal blanket을 이용하여 마우스의 체온을 37°C로 유지시켰다. 0.1% BSA를 함유한 Krebs-Henseleit buffer에 [ $^3\text{H}$ ]RSA (30  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )과 [ $^{125}\text{I}$ ]8D3 (10  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ )를 잘 혼합하여 1.25 ml/min으로 infusion함과 동시에 총경동맥을 수술실로 절찰하였다. 5분 동안 관류액을 주입한 후 즉시 단두하여 뇌의 우반구를 적출하고, 무게를 측정 한 후, 이미 보고된 논문의 방법

(Triguero 등, 1990)과 동일하게 생리완충액 (physiology buffer, PB)와 40% dextran을 사용하여 homogenation시키고 homogenate 일부를 취한 후 원심분리하였다. 뇌의 homogenate, 얻어진 상등액과 침전에서의 [ $^{125}\text{I}$ ]의 방사활성을 측정 한 후 즉시 가용화제로 용해시킨 후 [ $^3\text{H}$ ]의 방사활성을 측정하였다.

각각의 분획중의  $V_D$ 와 PS를 구하는 식은 다음과 같다.

$$V_D(\mu\text{l}/\text{g}) = \frac{\text{brain(dpm)}/\text{brain(g)}}{\text{perfusate(dpm)}/\text{perfusate Vol}(\mu\text{l})}$$

$$PS(\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}) = \frac{V_D(\mu\text{l}/\text{g})}{\text{perfusion rate}(\text{min})}$$

**실험결과**

**Pharmacokinetics of [ $^{125}\text{I}$ ]8D3**

Anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibody인 [ $^{125}\text{I}$ ]8D3의 혈장 중 클리어런스는 Fig. 1에서 보여지는 것과 같이 혈액-뇌 관문의 혈관내용적 표지자인 [ $^3\text{H}$ ]RSA는 투여후 360분에 투여한 약액의 60% 이상이 혈장중에 존재하는데 반하여, [ $^{125}\text{I}$ ]8D3는 투여량의 15%만이 혈장 중에 존재하여 빠른 조직 중의 분포양상을 나타내고 있다. 또한 이때 대사되지 않은 intact의 형태는 약 80% 이상을 나타내어 비교적 혈장중에서 안정함을 알 수 있다(Table 1).

약액을 투여한 후 2시간에서의 pharmacokinetic param-

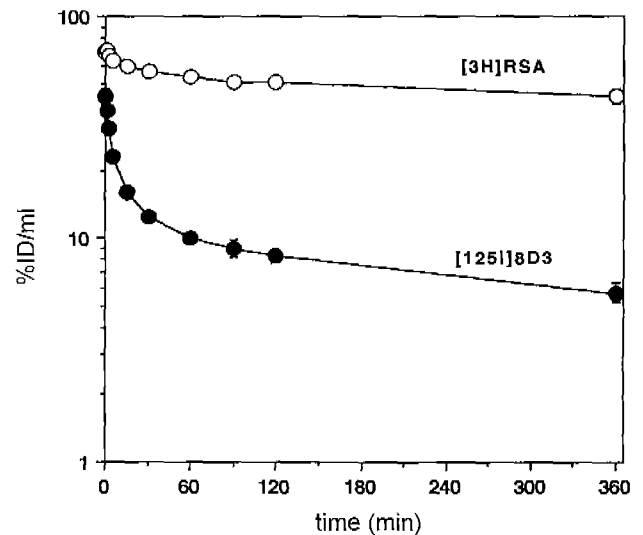


Fig. 1. Plasma concentration (%ID/ml) versus time profile of [ $^{125}\text{I}$ ]8D3 and [ $^3\text{H}$ ]RSA in anesthetized Balb/c mice. Data are means  $\pm$  S.E.M. (n=3).

**Table 1.** Plasma concentration and TCA precipitability of [<sup>125</sup>I]8D3

Time (min)	[ <sup>125</sup> I]8D3 (%ID/ml)	TCA (%)
0.25	43.9 ± 3.0	95 ± 1
1	37.7 ± 0.6	96 ± 0
2	31.2 ± 1.1	96 ± 1
5	23.4 ± 1.2	96 ± 1
15	16.0 ± 1.0	94 ± 1
30	12.4 ± 0.4	88 ± 1
60	10.0 ± 0.6	82 ± 1
90	9.01 ± 0.81	82 ± 1
120	8.26 ± 0.54	79 ± 2
360	5.69 ± 0.57	88 ± 2

Values are mean ± S.E. (n=3 rats).

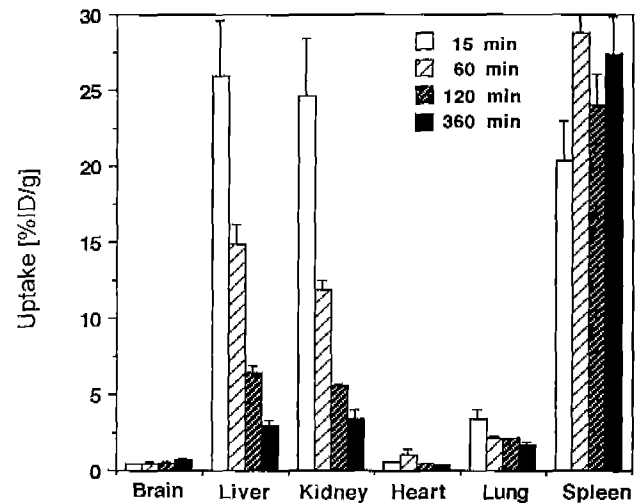
**Table II.** Pharmacokinetic parameters of [<sup>125</sup>I]8D3 at 2 hours after injection by intravenous injection technique

[ <sup>125</sup> I]8D3	
A <sub>1</sub> (%ID/ml)	28.7 ± 1.7
A <sub>2</sub> (%ID/ml)	14.5 ± 0.4
k <sub>1</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.22 ± 0.02
k <sub>2</sub> (min <sup>-1</sup> )	0.0052 ± 0.0004
t <sub>1/2</sub> (min)	
Distribution	3.21 ± 0.30
Elimination	137 ± 13
AUC <sub>0-120</sub> (%ID/min/ml)	1440 ± 80
AUCt (%ID/min/ml)	3010 ± 367
Vd <sub>ss</sub> (ml/kg)	6.30 ± 0.17
Cl <sub>t</sub> (ml/min/kg)	0.034 ± 0.004
MRT	189 ± 18

Values are means ± S.E. (n=3).

A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>, plasma radioactivity; k<sub>1</sub> and k<sub>2</sub>, rate constants; t<sub>1/2</sub>, half-life; V<sub>dss</sub>, steady-state volume of distribution; Cl<sub>t</sub>, total plasma clearance; MRT, mean resident time; AUC, area under the plasma concentration-time curve; Vd<sub>ss</sub>, steady state of distribution volume; ID, injected dose.

ters를 살펴보면, [<sup>125</sup>I]8D3의 분포 반감기는 약 3분인데 실질 반감기는 약 137분을 나타내었다. 또한 [<sup>125</sup>I]8D3의 전신분포용적은 6.3 ± 0.2 ml/min/kg이며, 혈장중농도시간 곡선하면적 (AUC)은 1440 ± 80 %ID/min/ml을 나타내었다 (Table 2). 또한 조직중의 투과량은 정맥 투여 후 2시간에서는 비장에서 24 ± 2%ID/g으로 가장 많이 투과되었고 간, 신장의 순으로 투과되었다 (Table 3). 시간에 따른 조직중의 투과량의 변화는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 시간이 경과함에 따라 간과 신장에서는 초기에 현저한 투과량의 증가를 보이다가 시간에 따라 감소하지만, 비장에서는 시간이 경과함에 따라 축적현상을 보이며 정맥 투여 후 360분에서는

**Fig. 2.** Organ uptake of [<sup>125</sup>I]8D3 by Balb/c mice at 15, 60, 120, 360 min after i.v. injection. Data are means ± S.E.M. (n=3).**Table III.** Organ uptakes of [<sup>125</sup>I]8D3 at 2 h after injection

organ	uptake	
	[ <sup>125</sup> I]8D3 (%ID/g)	[ <sup>3</sup> H]RSA (μl/g)
brain	0.50 ± 0.09	9.28 ± 0.65
liver	6.44 ± 0.50	99.7 ± 4.0
kidney	5.59 ± 0.18	112 ± 11
heart	0.44 ± 0.04	98.5 ± 4.9
lung	2.11 ± 0.08	214 ± 10
spleen	24.1 ± 2.0	104 ± 6

Data values are mean ± S.E (n=3)

다른 장기에 비하여 6배 이상 증가함을 보였다.

### Brain uptakes

Pharmacokinetics parameter로써 얻어진 정맥투여 후 120분에서의 AUC값을 이용하여 [<sup>125</sup>I]8D3의 뇌투과량 (%ID/g)과 혈액-뇌 관문 고유투과상수 (PS)를 계산한 결과는 각각 Table 3과 Fig. 3에 나타내었다. [<sup>125</sup>I]8D3의 뇌투과량은 약 0.5 %ID/g을 나타내었고, [<sup>125</sup>I]8D3의 PS는 초기 15분에서는 약 1.2 μl/min/g을 나타내었으며 정맥 투여 후 60분에서부터는 약 30%가 감소되어 약 0.4 μl/min/g을 나타냄으로써 뇌로부터 혈액으로 [<sup>125</sup>I]8D3가 efflux되고 있음을 알 수 있다.

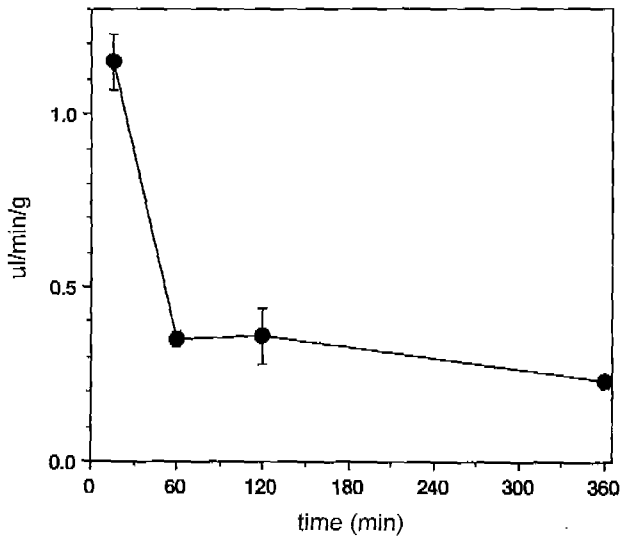
한편, 혈액중의 효소에 의한 대사에 대한 영향을 배제시키면서 뇌실질 조직중에 투과된 [<sup>125</sup>I]8D3의 투과량을 검토한 결과는 Table 4에 나타낸 바와 같이 [<sup>3</sup>H]RSA의 뇌 homogenate의 4배 이상의 양이 투과되며 투과된 양의 75% 이상이 뇌실질 조직중으로 투과되었고 약 20% 미만의 투과량이 뇌혈관중에 존재하고 있음을 보이고 있다.

**Table IV.** Distribution volume of brain ( $V_D$ ) determined with internal carotid artery perfusion/capillary depletion method

Perfusate	VD ( $\mu$ l/g)		
	Homogenate	supernatant	Pellet
[ $^{125}$ I]8D3	22.3 $\pm$ 2.7	16.9 $\pm$ 2.2	4.23 $\pm$ 1.52
[ $^3$ H]RSA	4.92 $\pm$ 0.61	-	4.67 $\pm$ 0.68

Values are means  $\pm$  S.E. (n=3).

Perfusion time is 5 min at a flow rate of 1.25 ml/min.



**Fig. 3.** Time course of blood-brain barrier permeability surface area product of [ $^{125}$ I]8D3 in anesthetized Balb/c mice after i.v. injection. Data are means  $\pm$  S.E.M. (n=3).

**고 찰**

본 연구는 새로 개발된 transferrin receptor (TfR) monoclonal antibody (mAb)인 8D3가 마우스에서 뇌로 투과되는 지를 혈관내 표지자인 rat serum albumin (RSA)과 동시에 투여하여 확인한 것으로 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

첫째, 정맥내 투여 후 120분에서의 뇌투과율이 약 0.50 %ID/g으로 이 값은 흰쥐에서 TfR에 대한 mAb인 OX26의 뇌투과율 (약 0.32 %ID/g)(Pardridge 등, 1991)에 상당한 값으로 BBB를 통하여 투과가 잘 되고 있음을 알 수 있다. 둘째, 이 물질은 주로 간과 신장을 통하여 배설되며 특히 비장에 많이 축적되고 있다 (Table 3, Fig. 2). 셋째, 정맥내 투여후 15분에 뇌투과 상수의 최고치를 나타내며 그 후부터 6시간 까지는 일정한 값을 나타내고 있다 (Fig. 3). 넷째, 뇌분포용적의 75% 이상이 뇌세포내로 receptor-mediated transcytosis에 의하여 투과되고 있다 (Table 4).

본 연구결과 중 RSA를 동시에 투여하여 8D3의 혈중 클리어런스를 비교해 높은 것을 살펴보면 (Fig. 1) 그 패턴

이 severe combined immune deficiency (SCID) 마우스에서 후천적 면역 결핍증의 면역요법제인 면역글로블린 (IVIG)을 양이온화한 것과 아닌 것을 동시에 정맥투여하여 2시간에서 비교한 것 (Pardridge 등, 1996)과 유사한 양상을 보여주고 있다. 그런데 이 결과에서 얻은 양이온화한 IVIG의 뇌투과율은 약 0.065%ID/g으로 같은 시간에서 8D3의 뇌투과율과 비교해보면 8D3가 약 7.7배 높은 뇌투과율을 나타내고 있다. 또한 oncogene-specific monoclonal antibody (D146)를 양이온화시켜 BALB/c 마우스에 정맥투여하여 2시간후의 뇌투과율을 검토한 연구보고 (Pardridge 등, 1995b)에서는 양이온화한 D146의 뇌투과율이 약 0.14 %ID/g으로 8D3의 뇌투과율의 약 1/3의 값을 나타내고 있다. 한편 다른 조직으로의 분포양상은 간과 신장에 많이 분포되고 있고 특히 비장에 많이 분포되고 있는데 시간이 경과 함에 따라 다른 조직에서는 감소하는 양상을 보이지만 비장에서는 변화하지 않거나 증가하는 현상이 IVIG의 경우와 유사하게 나타나고 있다 (Table 3, Fig. 2).

본 결과는 처음으로 마우스에서 변형시키지 않는 뇌관류법을 적용시켜 8D3가 BBB를 투과하여 뇌로 송달되고 있음을 보여주는 연구보고이다. 이미 정맥투여법으로 검토한 다른 연구 (Lee 등, 2000)에서 8D3가 뇌로 투과된다는 보고가 있지만, 마우스는 크기가 작아 정교한 기술이 요구되므로 뇌관류법의 시행은 이루어지지 않았고, 또한 투여 2시간에서의 뇌분포용적을 알아보는 실험을 하지 않았기 때문에 두 연구 결과를 직접 비교하기는 어렵지만 각 시간대에서 8D3가 뇌로 투과한다는 결과는 일치한다. 또한 본 연구 결과는 뇌관류 후 capillary depletion method (CDM)을 이용하여 투과된 8D3가 뇌혈관에 머무르지 않고 transferrin receptor를 이용하여 뇌세포내로 송달되고 있음을 잘 나타내 주고 있다 (Table 4). 그러므로 본 연구결과는 마우스에 약물을 뇌로 송달 시키기 위하여 8D3를 벡터로서 사용 가능하며 뇌투과율을 검토하기 위하여 마우스에도 뇌관류법을 적용시켜 정확한 평가가 가능함을 보여주고 있다.

**감사의 말씀**

본 연구는 숙명여자대학교 2000학년도 교내연구비 지원

에 의해 수행되었으며, 이 연구가 수행되도록 도와준 U. Bickel박사에게 감사 드립니다.

### 참고문헌

- Bickel, U., Yoshikawa, T. and Pardridge, W. M. (1993). Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **10**, 205-245.
- Gibaldi, M. and Perrier, D. (1982). Pharmacokinetics, pp. 1-329. Marcel Dekker Inc., New York
- Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science*, **240**, 1468-1474
- Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Williams, A. F. and Hunt, V. (1985). Analysis of lymphopoietic stem cells with a monoclonal antibody to the transferrin receptor. *Immunology*, **54**, 333-341.
- Kang, Y.S. (1997). Vector-mediated delivery of <sup>125</sup>I-labeled opioid peptide, [Lys7]dermorphin (K7DA), through the blood-brain barrier. *J. Appl. Pharmacol.*, **5**, 53-58.
- Kang, Y. S., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (1995). Pharmacokinetics and organ clearance of a 3'-biotinylated, internally [<sup>32</sup>P]-labeled phosphodiester oligodeoxynucleotide coupled to a neutral avidin/monoclonal antibody conjugate. *Drug Metabol. Dispos.*, **23**, 1, 55-59.
- Kang, Y. S. and Kim, J. M. (1999). Permeability of a capsaicin derivative, [<sup>14</sup>C]DA-5018 to blood-brain barrier corrected with HPLC method. *Arch. Pharm. Res.*, **22**, 2, 99-105.
- Kang, Y. S. and Kim, Y. J. (2000). The simple *in vivo* evaluation method for blood-brain barrier permeability of drugs in mice. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **30**, 99-105.
- 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. Pharm. Exp. Ther.*, **269**, 344-350.
- Kissel, K., Hamm, S., Schulz, M., Vecchi, A., Garlanda, C. and Engelhardt, B. (1998). Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem. Cell Biol.*, **110**, 63-72.
- Lee, H. J., Engelhardt, B., Lesley, J., Bickel, U. and Pardridge, W.M. (2000). Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through the blood-brain barrier in mouse. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **292**, 1048-1052.
- Pardridge, W. M., Boado, R. J. and Kang, Y. S. (1995a). 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.
- Pardridge, W. M., Kang, Y. S., Yang, J. and Buciak, J. L. (1995b). Enhanced cellular uptake and *in vivo* biodistribution of a monoclonal antibody following cationization. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 943-948.
- Pardridge, W. M., Buciak, J. L., Friden, P. M. (1991). Selective transport of anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier *in vivo*. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **259**, 66-70.
- Pardridge, W. M., Kang, Y. S., Diagne, A. and Zack, J. A. (1996). Cationized hyperimmune immunoglobulins: Pharmacokinetics, toxicity evaluation and treatment of human immunodeficiency virus-infected human-peripheral blood lymphocytes-severe combined immune deficiency mice. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **276**, 246-252.
- 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**, 5, 738-746.
- Pardridge, W. M., Kang, Y. S., Buciak, J. L. and Yang, J. (1995). 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**, 6, 807-816.
- Pardridge, W. M., Kang, Y. S., Yang, J. and Buciak, J. L. (1995). Enhanced cellular uptake and *in vivo* biodistribution of anti-ras monoclonal antibody following cationization. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 8, 943-948.
- Smith, Q. R. (1996). Brain perfusion system for studies of drug uptake and metabolism in the central nervous system: In Models for assessing drug absorption and metabolism, Plenum Press, New York, pp. 285-307.
- Takasato, Y., Rapoport, S. I. and Smith, Q. R. (1984). An *in situ* brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.*, **247**, H484-493.
- Triguero, D., Buciak, J. B. and Pardridge, W. M. (1990). Capillary depletion method for quantifying blood-brain barrier transcytosis of circulating peptides and plasma proteins. *J. Neurochem.*, **54**, 1882-1888.
- Wu, D., Yang, J. and Pardridge, W. M. (1997). Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier *in vivo* with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *J. Clin. Invest.*, **100**, 1804-1812.