

암세포 표적지향화를 위한 항체-엔도스타틴 융합단백질의 체내동태 및 종양으로의 이행성

강영숙[†] · 이나영

숙명여자대학교 약학대학

(2003년 11월 7일 접수 · 2003년 12월 5일 승인)

In Vivo Tumor Cell Distribution of Antibody-Endostatin Fusion Protein for Tumor-Specific Targeting and Pharmacokinetics

Young-Sook Kang[†] and Na-Young Lee

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

(Received November 7, 2003 · Accepted December 5, 2003)

ABSTRACT—A novel antitumor agent, antibody-endostatin fusion protein (anti-HER2/neu IgG3C_H3-Endostatin, AEFP) formed by genetic engineering procedure from antibody (Ab) which specifically targets to tumor cells and angiogenesis inhibitor, endostatin (Endo) that has excellent antitumor effect, minimizes the toxicity of normal cells and selectively kills only tumor cells. The purpose of this study is to evaluate the pharmacokinetic parameters and to analyze the localization of AEFP. After an intravenous injection of 150 μ l (5 μ Ci) [¹²⁵I]Ab, [¹²⁵I]AEFP to mice, blood was collected through retro-orbital plexus from 15 min to 2880 min. Following the jugular vein injection of 150 μ l (10 μ Ci) [¹²⁵I]Endo, blood was collected by the use of carotid artery cannulation from 0.25 min to 30 min. Consequently, Endo was very rapidly removed from plasma compartment within 30 min. On the other hand, AEFP similar to Ab was slowly cleared from plasma. Also, Endo was metabolized about 40% within 30 min. However, AEFP was shown to metabolize less than 10% within 2880 min. The organ distribution of Endo was in order kidney, lung, spleen. Both Ab and AEFP were localized in order spleen, kidney, liver. Furthermore the tumor/blood distribution ratio of AEFP at 96 hours after injection is about 20 times higher than it of Endo at one hour after injection. In conclusion, these studies demonstrate that the anti-cancer or suppression of angiogenesis effect of Endo may be improved by the use of AEFP because the longer half life and stability of AEFP is able to selectively target antigens expressed on tumors.

Key words—Antibody-endostatin fusion protein, Pharmacokinetics, Tumor targeting

항암제의 개발에 있어서는 암의 성장과 전이에 필수적인 신생혈관의 생성을 억제시켜야 함은 물론 약제내성을 획득하지 않는 제제의 개발이 매우 중요하다. 그런데, 종양의 성장을 막기 위해서 엔도스타틴(endostatin, Endo)을 여러 주기로 투여하였을 때 약제내성을 나타내지 않으며 신생혈관 억제효과를 나타낸다는 보고가 있다.¹⁻²⁾ 또한 상피세포의 증식을 강력히 억제하는 효과를 나타내기도 하고, 또 Endo의 전신투여는 1차 종양을 뚜렷한 독성을 나타내지 않으면서 잠재적인 작은 병소로 전환시켰음이 보고되었다.³⁻⁴⁾ 한편, 누드마우스 모델에서 신장 세포 암의 성장 억제를 위해서는 매일 10 mg/kg의 Endo를 전신 투여하여야 하고,⁵⁾ 항암효과를 극대화시키기 위해서는 Endo를 반복 투여하거나 장기간 투여하여야 한다. 그러나 실제로 임상적으로 인체에 고용량을 적용하기는 용이한 일이 아니다.⁶⁾ 그러므로 이러한 문제점 등을 해결하

기 위해서는 Endo의 생체내 이용율을 증가시키거나 특이적으로 국소종양부위에 타기팅하는 수법이 요구된다. 이러한 목적을 달성하기에 적합한 방법의 하나로써 종양 특이 항체와 융합시킨 단백질을 투여하는 방법이 있는데 이러한 방법 중 성공한 예로는 뇌의 타기팅을 위하여 혈액-뇌 관문에서 많이 존재하는 transferrin receptor에 결합하는 항체를 이용하여 뇌 투과가 되지 않는 물질의 뇌 투과를 촉진시켰다는 보고 등이 있다.⁷⁾ HER2/neu는 protooncogene으로써 유방이나 난소의 종양에서 과다 생성되는데, HER2/neu의 과다 생성은 암의 전이와 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁸⁻⁹⁾ 이러한 HER2/neu에 특이적인 항체가 HER2/neu가 발현된 유방암 및 난소암 환자에서 많이 발견되었다는 보고 등이 있는데,⁹⁾ 이것은 종양치료제 개발에 있어서 HER2/neu가 좋은 표적물질이 됨을 의미하는 것이다. 그러므로 본 연구에서는 HER2/neu에 특이적인 항체를 이용한 Endo의 융합단백의 체내동태를 조사하고 종양세포로의 타기팅이 가능한지를 각 항체를 방사성 표식체로 라벨화시켜 검토하고자 하였다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)710-9562 , E-mail : yskang@sookmyung.ac.kr

실험 방법

실험재료

$^{125}\text{I-Na}$ (1 mCi/10 μl)는 DuPont NEN제품(부경사, 서울, 한국)을 구입하여 사용하였고 anti-HER2/neu IgG3(Ab)와 anti-HER2/neu IgG3- $\text{C}_{\text{H}3}$ -endostatin fusion protein(AEFP) 및 엔도스타틴(Endo)은 각각 신 등의 방법⁸⁻⁹⁾에 따라 정제하거나 재구축한 것을 한림대학교 생명과학 연구소로부터 제공받아 실험하였다. 흰쥐 혈청 알부민(RSA, fraction V)과 기타 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

실험동물은 체중 20-25 g의 Balb/c 마우스를 대한동물센터에서 구입하여 일정기간 사육한 후 사용하였다.

Ab, AEFP 및 Endo의 Radiolabeling

Ab, AEFP 및 Endo 각각 100 μg 에 $^{125}\text{I-Na}$ 0.5 mCi를 가하여 이미 보고한 chloramine-T 방법¹⁰⁾을 사용하여 라벨화를 하였다. 간단하게 설명하면, 1.5 ml eppendorf tube에 0.4 M 인산완충용액(PBW)으로 희석한 $^{125}\text{I-Na}$ 0.5 mCi와 Ab, AEFP 및 Endo 각각 100 μg 과 chloramine-T 용액을 가한 후, 1분 동안 반응시킨 다음, sodium metabisulfite를 가하여 반응을 중지시킨 후, 0.01 M 인산 완충 식염수(PBS)로 희석시킨다. 비라벨화 단백질과 free iodine을 Sephadex G-25 column을 통하여 제거시킨 후 라벨화 단백질은 10% trichloroacetic acid(TCA)로 10분간 반응시킨 후 원심분리 후 얻은 침전의 방사활성을 확인하여 95% 이상을 나타내는 것을 사용하였다.

약물투여 및 혈액과 조직 채취법

이미 보고한 논문의 방법¹¹⁻¹²⁾과 마찬가지로 25-30 g의 여성 마우스에 ketamine(100 mg/kg)과 xylazine(2 mg/kg)을 근육 주사하여 마취시킨 후 $^{125}\text{I}[\text{Ab}$ (5 μCi /마우스), $^{125}\text{I}[\text{AEFP}$ (5 μCi /마우스) 및 $^{125}\text{I}[\text{Endo}$ (10 μCi /마우스)를 각각 0.1% RSA를 함유한 Ringer's-HEPES buffer(RHB, pH 7.4; 10 mM HEPES, 14 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.8 mM CaCl_2)에 혼합하여 조제한 액 50 μl 를 주사기에 넣어 경정맥으로 주입하였다. $^{125}\text{I}[\text{Ab}$ 또는 $^{125}\text{I}[\text{AEFP}$ 를 투여한 마우스는 후 안와총으로부터 각각 15, 30, 60, 180, 360, 540, 1440 및 2880분에 혈액을 취하고 $^{125}\text{I}[\text{Endo}$ 를 투여한 마우스는 경정맥에 폴리에틸렌 관(PE 45)을 삽입하여 15초, 1, 2, 5, 15 및 30분에 혈액 50 μl 를 취하여 원심분리한 후, 혈장 20 μl 을 얻어서 감마카운터(γ -counter) (Packard Co. USA)로 ^{125}I 의 방사활성을 측정하였다. 또한 혈장 중의 투여약물의 대사

정도를 알아보기 위하여 혈장에 10% TCA 500 μl 를 가하여 원심분리한 후 얻은 침전의 방사활성을 확인하였다.

$^{125}\text{I}[\text{Ab}$ 또는 $^{125}\text{I}[\text{AEFP}$ 를 투여한 마우스는 각각 약액 투여 후 2880분에, $^{125}\text{I}[\text{Endo}$ 를 투여한 마우스는 약액 투여 후 30분에 PBS 20 ml를 마우스에 관류시킨 후 즉시 심장, 폐, 간, 비장, 신장 및 근육을 적출하여 칭량하고 각 조직의 ^{125}I 의 방사활성을 측정하였다.

약물속도론적 파라미터와 조직분포

약물동태 파라미터는 혈장 중 방사활성 데이터를 UCLA Health Science Computing Facilities에서 개발한 derivative-free nonlinear regression analysis(PARBMDF, Biomedical Compute P Series)를 이용하여 2차 지수함수(biexponential equation)에 적용하여 Gibaldi와 Perrier의 정의¹³⁾에 따라 계산하였다.

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

여기에서 $A(t)$ 는 혈장 중 방사활성의 %ID/ml이며 ID는 투여량이다.

커브 피팅시 기증치는 $1/(\text{농도})^2$ 을 이용하였으며 여기에서 농도는 %ID/ml을 의미한다. 혈장 중 클리어런스(plasma clearance, CL), 정상상태(steady-state)에서의 분포용적(apparent volume of distribution, V_{dss}), 혈장 중 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.¹⁴⁾

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

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

여기서 D는 투여량(dose)이다.

각 장기로의 투과 고유상수, PS($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$)는 다음과 같이 계산되었다.¹⁵⁾

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

$C_p(t)$ =시간 t에서의 혈장중 농도

$C_p(T)$ =최종상의 혈장중 농도

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

V_D =각 장기에서의 물질의 분포용적

여기서 각 장기의 V_0 는 문헌치¹⁶⁾로 보정하였다.

정맥 투여 일정 시간 후에 다른 장기로 약물이 송달될 양은 %ID/g으로 나타낼 수 있고 이 때 ID는 투여량이며, 다음과 같이 PS와 AUC로부터 구할 수 있다.¹⁵⁾

$$\%ID/g(t) = PS \times AUC(t)$$

종양 타기팅

4-6주령의 Balb/c 마우스에 CT26-HER2/neu 1×10⁶ cell을 7일 동안 매일 피하주사한 후 종양이 생성된 것을 확인한 후, 꼬리정맥으로 각각 [¹²⁵I]로 라벨화한 anti-dansyl IgG3 32 μCi, Ab 32 μCi, AEFP 30 μCi 및 Endo 24 μCi를 각각 투여한 후 Endo를 투여한 마우스만 1시간 경과 후 종양과 혈액을 채취하고 나머지 그룹의 마우스는 96시간 후에 종양과 혈액을 채취하여 각각 방사활성을 감마카운터로 측정하여 각 측정 시간대에 있어서의 혈액에 대한 종양세포로의 분포 비를 구하였다.

통계처리

모든 데이터는 각 실험 횟수에 대한 평균과 표준오차(mean±S.E.M.)로 표시하였다. 두 그룹간의 유의성은 Student's *t*-test로 계산하고 p<0.05를 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 혈관신생 억제제인 엔도스타틴(Endo)의 생체내 이용율을 증가시키기 위한 목적으로 Endo를 anti-HER2/neu IgG3(Ab)의 중쇄의 C_H3에 유전공학적으로 융합시킨 anti-HER2/neu IgG3-C_H3-endostatin fusion protein(AEFP)로 표현되는 약 220 kDa에 해당되는 단백질의 체내동태와 종양세포로의 타기팅을 검토하였다. ¹²⁵I-Na로 라벨화시킨 Ab와 AEFP 및 Endo를 각각 마우스에 정맥 투여하여 48시간 또는 30분까지 혈장 중에서 소실되는 패턴을 Figure 1에 나타내었는데 Endo는 30분 이내에 투여한 약액 중 90% 이상이 혈중에서 소실되었고 그때 남아있는 약액의 65%만이 대사되지 않은 상태로 남아 있었지만 AEFP는 Ab와 유사하게 48시간까지 투여한 약액의 10%가 혈중에 남아있었고 그 중의 90% 정도가 대사되지 않은 상태인 미변화체로 존재하였다(Table I). Table II에는 각 항체들의 약물속도론적 파라메타들을 산출하여 표기하였는데 Endo는 소실 반감기가 약 22분으로 급속하게 혈중에서 소실되고 있는 반면에 융합단백질인 AEFP는 Ab와 유사한 소실반감기를 나타냄으로써 Endo의 소실 반감기의 약 110배 정도로 혈중으로부터 느리

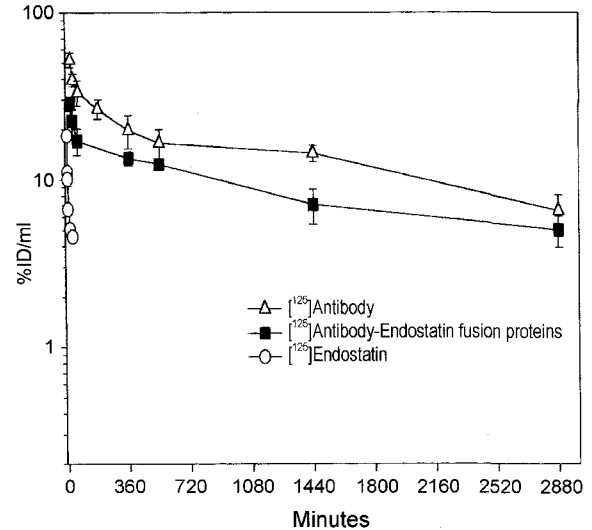


Figure 1—The % injected dose (ID) per of plasma-time profile of [¹²⁵I]antibody (Ab), [¹²⁵I]antibody-endostatin fusion proteins (AEFP) and [¹²⁵I]endostatin (Endo) after intravenous injection in anesthetized mice for up to 30 min ([¹²⁵I]Endo) or 2880 min ([¹²⁵I]Ab and [¹²⁵I]AEFP). Data are mean±S.E.M. (n=3 mice per point).

Table I—TCA Precipitability of [¹²⁵I]Ab, [¹²⁵I]AEFP and [¹²⁵I]Endo in Plasma Following Intravenous Injection to Mice

Time (min)	TCA%		
	[¹²⁵ I]Ab	[¹²⁵ I]AEFP	[¹²⁵ I]Endo
0.25	—	—	87±3
1	—	—	85±1
2	—	—	80±2
5	—	—	66±4
15	97±1	96±1	62±4*
30	94±1	96±1	65±1*
60	94±1	94±1	—
180	93±1	—	—
360	93±1	92±1	—
540	92±0	90±1	—
1440	92±1	93±2	—
2880	93±2	90±5	—

Data values are mean±S.E.M. (n=3).

*p<0.05 significantly different from control, [¹²⁵I]Ab.

게 소실되고 있다. 또한 AEFP의 정상상태에서의 분포용적은 Endo와 유사하게 나타내었으며 총 혈장-시간 곡선하 면적(AUC_{tot})은 Endo의 AUC_{tot}의 130배 증가된 값을 나타내었고 총 혈장 중 클리어런스(CL_{tot})는 97배 정도 작은 값을 나타내었다. 그러므로 Endo를 융합 단백질로 변화시킴으로써 혈장 중의 소실속도가 억제될 뿐만 아니라 안정성이 유지됨을 알 수 있었다. 본 결과와 마찬가지로 이전의 보고에서 사이토카인(cytokine)인 GM-CSF를 anti-HER2/neu monoclonal

Table II—Pharmacokinetic Parameters of [¹²⁵I]Ab, [¹²⁵I]AEFP and [¹²⁵I]Endo Obtained After Intravenous Injection to Mice

Parameter	[¹²⁵ I]Ab	[¹²⁵ I]AEFP	[¹²⁵ I]Endo
A ₁ (%ID/ml)	46.4±2.9	24.0±2.4	9.69±0.66*
A ₂ (%ID/ml)	22.5±5.9	11.6±2.8	—
k ₁ (min ⁻¹)	0.035±0.015	0.025±0.003	0.032±0.003
k ₂ (min ⁻¹)	0.000411±0.000136	0.000290±0.000020	—
t ¹ _{1/2} (min)	41.5±26.6	28.8±3.4	—
t ² _{1/2} (min)	2393±1095	2413±174	21.8±1.9*
MRT (min)	3285±1450	3387±226	31.5±2.7*
Vd _{ss} (ml/kg)	306±69	505±147	453±28*
AUC ₁ (%ID*min/ml)	39469±6779	23367±5221	186±8*
AUC _{tot} (%ID*min/ml)	88448±35608	40033±8119	302±17*
CL _{tot} (ml/min/kg)	0.11±0.03	0.15±0.03	14.5±0.81*

Data values are mean±S.E.M. (n=3).

*p<0.05 significantly different from control, [¹²⁵I]Ab.

A₁ and A₂, plasma radioactivity; k₁ and k₂, rate constants; t¹_{1/2} and t²_{1/2}, half-life of the distribution and elimination phase, respectively; MRT, mean residence time; Vd_{ss}, steady-state volume of distribution; AUC₁ and AUC_{tot}, the first 2880 minutes (in the case of Ab and AEFP, in the case of Endo is 30 min after injection) and steady-state area under the plasma concentration-time curve; CL_{tot}, total plasma clearance.

Table III—Comparison of Organ Uptake of [¹²⁵I]Ab, [¹²⁵I]AEFP and [¹²⁵I]Endo in Mice After Intravenous Injection

Organ	%ID/g		
	[¹²⁵ I]Ab	[¹²⁵ I]AEFP	[¹²⁵ I]Endo
Heart	0.45±0.05	1.13±0.25*	0.91 0.52
Lung	0.45±0.10	0.30±0.07	3.00 1.91*
Liver	0.78±0.31	6.62±1.58*	1.21 0.34
Spleen	1.52±0.20	27.0±10.1*	2.13±0.53
Kidney	1.51±0.29	15.7±4.2*	3.89±0.78*
Muscle	0.32±0.12	0.29±0.07	0.37±0.13

Data values are mean±S.E.M. (n=3).

*p<0.05 significantly different from control, [¹²⁵I]Ab.

항체에 유전공학적으로 융합시킨 anti-HER2/neu IgG3-(GM-CSF) 융합 단백질이 GM-CSF의 혈중 안정성을 증가시켰고,⁹⁾ 후천성 면역 결핍증의 치료제로서 Anti-HIV antisense 약물인 peptide nucleic acid(PNA)를 transferrin receptor 항체-avidin과 융합 단백질을 형성하였을 때도 PNA의 혈중 안정성이 증가될 뿐만 아니라 뇌 조직으로의 이행이 증가되는 결과를 나타내었다.^{7,17)} 또한 조직분포를 비교해 보면 Endo는 신장, 폐, 비장의 순서로 많이 분포되었는데 AEFP는 비장, 신장, 간장의 순서로 많이 분포되었다(Table III). 조직분포의 양상은 항체와 avidin의 융합단백질의 경우에는 주로 간장에 많이 분포되고 있는데^{7,17-18)} Endo의 경우는 주로 신장과 폐를 통하여 배설되고 있지만 AEFP는 48시간 이내에 비장과 신장을 통하여 주사한 액의 약 40 %ID/g이 소실되고 있는데, 이것은 Ab의 소실 특성과 유사하였다. 특히 Endo는 혈중에서 빠르게 대사되어 치료효과를 얻기 위해서 고용량으로 자주 투여해야 하는데,⁵⁾ 본 실험 결과 AEFP가

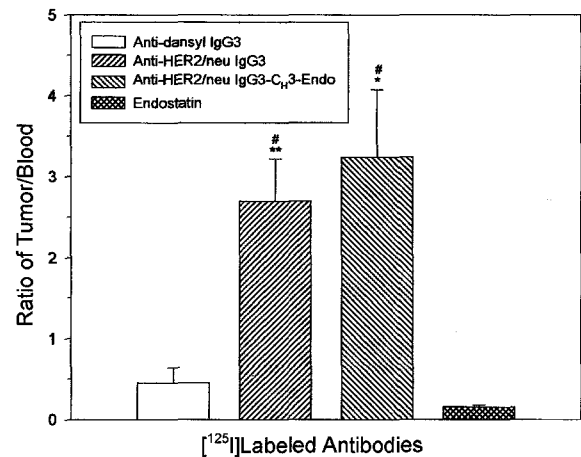


Figure 2—Targeting of anti-HER2/neu IgG3-C_H3-endostatin (AEFP) to CT26-HER2/neu in Balb/c mice. Four groups of mice were injected s.c. with 10⁶ single cell suspensions of CT26-HER2/neu. [¹²⁵I] labeled antibodies were injected through the tail of mice and targeting of tumors were measured by CPM/g of tissue at 96 hours or 1 hour (Endo) after injection. Tumor targeting is expressed as the ratio of CPM/g tumor over CPM/ml blood. Data are mean±S.E.M. (n=3 mice per point). *p<0.05, **p<0.01 significantly different from control, anti-dansyl IgG3 and #p<0.01 significantly different from control, endostatin.

신장의 경우 Endo에 비해 약 4배 많은 양이 분포됨으로써 신장 세포암의 성장 억제를 위하여 고용량을 투여하지 않고도 바람직한 효과를 얻을 가능성을 시사하고 있다.

한편 항체들의 종양세포로 이행되는 특성을 비교한 결과를 Figure 2에 나타내었는데 대조군으로 사용한 anti-dansyl IgG3보다 Ab나 AEFP가 각각 5.8, 7.0배 이상 종양세포로 특이적으로 이행되었고 AEFP는 Endo의 20배 이상의 값을

나타내었다. 이러한 결과는 본 실험에서 사용한 Ab가 HER2/neu에 대하여 특이성을 갖고 있기 때문에 면역작용을 나타낼 뿐 아니라¹⁹⁾ Ab와 여러 종양 치료제를 융합시킬 경우 그 치료제의 효과를 높일 수 있다는 것을 의미하는 것이다. 이전의 연구에서도 항체-융합 단백질을 형성함으로써 종양특이성과 항종양활성을 증가시킨 경우가 있는데, 조혈세포의 성장과 분화에 관련된 cytokine인 GM-CSF와 anti-human HER2/neu IgG3와의 융합단백질은 GM-CSF에 비해 종양 특이성을 나타내어 항종양 활성을 증가시켰고,^{9,20)} glucose oxidase나 β -galactosidase의 anti-transferrin receptor-avidin 융합단백질을 암세포에 특이적으로 송달시킨 것이 보고되었다.²¹⁾ 이상의 결과로 AAFP는 암세포 특이적인 타기팅을 하기에 적합한 융합 단백질임과 동시에 임상적으로 고용량의 Endo를 사용하지 않고 암 억제제의 극대화와 부작용을 경감시킬 수 있는 좋은 송달 방법임을 알 수 있었다.

결 론

항체-엔도스타틴 융합단백질(AAFP)와 엔도스타틴(Endo)의 체내동태와 암세포로의 이행성을 비교한 결과, Endo는 투여한 후 30분 이내에 혈중에서 빠르게 소실되는 반면에 AAFP의 경우는 느리게 소실되었다. 또한 Endo는 약액 투여 후 30분에 혈중에 남아 있는 약액의 약 65%만이 변화되지 않은 채로 남아 있었지만, AAFP는 투여 후 2880분에도 약 90% 이상이 대사되지 않은 상태로 남아 있어 혈중의 안정성이 증가되었다. 조직분포를 살펴보면 Endo는 신장, 폐, 비장 순으로 많이 분포되며 AAFP는 비장, 신장, 간의 순서대로 많이 분포되는 양상을 보였다. 또 종양세포로의 타기팅의 결과는 Endo보다 AAFP에서 혈액으로부터 종양세포로의 분포비가 상당히 높게 나타남으로써 항체-Endostatin 융합단백질의 형성은 Endo의 개선된 항암효과를 기대할 수 있는 좋은 송달 방법의 하나임을 알 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2003년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이 연구가 수행되도록 도와 준 현재 마이애미 대학의 의학부 소속 암 연구소의 신승연 박사와 한국 오즈카 제약(주)의 배선희에게 감사를 드립니다.

문 헌

1) J. Folkman. Angiogenesis and metastatic growth, *Adv. Oncol.*, **12**, 2-7 (1996).

2) J. Folkman and D. Hanahan, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell*, **86**, 353-364 (1996).

3) T. Boehm, J. Folkman, T. Browder and M.S. O'Reilly. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance, *Nature*, **390**, 404-407 (1997).

4) M.S. O'Reilly, T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W.S. Lane, E. Flynn, J.R. Birkhead, B.R. Olsen and J. Folkman. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell*, **88**, 277-285 (1997).

5) M. Dhanabal, R. Ramchandran, R. Volk, I.E. Stillman, M. Lombardo, M.L. Iruela-Arispe, M. Simons and V.P. Sukhatme. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma, *Cancer Res.*, **59**, 189-197 (1999).

6) Y. Cao. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer, *Haematologica*, **84**, 643-650 (1999).

7) S.U. Shin, P. Friden, M. Moran, T. Olson, Y.S. Kang, W.M. Pardridge and S.L. Morrison. Transferrin-antibody fusion proteins are effective in brain targeting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2820-2824 (1995).

8) M.L. Penichet, J.S. Dela Cruz, S.U. Shin and S.L. Morrison. A recombinant IgG3-(IL-2) fusion protein for the treatment of human HER2/neu expressing tumors, *Hum. Antibodies*, **10**, 43-49 (2001).

9) J.S. Dela Cruz, K.R. Trinh, S.L. Morrison and M.L. Penichet. Recombinant anti-human HER2/neu IgG3-(GM-CSF) fusion protein retains antigen specificity and cytokine function and demonstrates antitumor activity, *J. Immunol.*, **165**, 5112-5121 (2000).

10) Y.S. Kang. Vector-mediated delivery of ¹²⁵I-labeled opioid peptide, [Lys⁷]dermorphin (K7DA), through the blood-brain barrier, *J. Appl. Pharmacol.*, **5**, 53-58 (1997).

11) 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).

12) W.M. Pardridge, Y.S., Kang, A. Diagne and J.A. Zack. 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 (1996).

13) M. Gibaldi and D. Perrier. *Pharmacokinetics*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 1-329 (1982).

14) Y.S., Kang, R.J. Boado and W.M. Pardridge. Pharmacokinetics and organ clearance of a 3'-biotinylated, internally [³²P]-labeled phosphodiester oligodeoxynucleotide coupled to a neutral avidin/monoclonal antibody conjugate, *Drug Metabol. Dispos.*, **23**, 55-59 (1995).

15) 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. Pharm. Exp. Ther.*

- 269, 344-350 (1994).
- 16) Y.S. Kang. 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, *J. Appl. Pharmacol.*, **10**, 37-42 (2002).
- 17) S.U. Shin, D. Wu, R. Ramanathan, W.M. Pardridge and S.L. Morrison. Functional and pharmacokinetic properties of antibody-avidin fusion proteins, *J. Immunol.*, **158**, 4797-4804 (1997).
- 18) M.L. Penichet, Y.S. Kang, W.M. Pardridge, S.L. Morrison and S.U. Shin. An antibody-avidin fusion protein specific for the transferrin receptor serve as a delivery vehicle for effective brain targeting: initial applications in anti-HIV antisense drug delivery to the brain, *J. Immunol.*, **163**, 4421-4426 (1999).
- 19) J.Y. Lee, D.H. Kim, Y. Chung, S.U. Shin and C.Y. Kang. Comparison of the antitumor efficacies of HER-2/*neu* DNA vaccines inducing contrasting IgG immunity but comparable CTL activity in mice, *Vaccine*, **21**, 521-531 (2003).
- 20) K.M. Kim, E.Y. Shin, J.H. Moon, T.H. Heo, J.Y. Lee, Y. Chung, Y.J. Lee, H.M. Cho, S.U. Shin and C.Y. Kang. Both the epitope specificity and isotype are important in the antitumor effect of monoclonal antibodies against HER-2/*neu* antigen, *Int. J. Cancer*, **102**, 428-434 (2002).
- 21) P.P. Ng, J.S.D. Cruz, D.N. Sorour, J. M. Stinebaugh, S.U. Shin, D.S. Shin, S.L. Morrison and M.L. Penichet. An anti-transferrin receptor-avidin fusion protein exhibits both strong proapoptotic activity and the ability to deliver various molecules into cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10706-10711 (2002).