

人血清白蛋白和人干扰素 $\alpha 2b$ 的融合蛋白在毕赤酵母中的表达 Expression in *Pichia pastoris* and Properties of Human Serum Albumin-Interferon $\alpha 2b$ Chimera

唱韶红¹, 巩 新¹, 杨志愉², 王同映², 马国昌², 马清钧¹, 吴 军^{1*}

CHANG Shao-Hong¹, GONG Xin¹, YANG Zhi-Yu², WANG Tong-Ying², MA Guo-Chang², MA Qing-Jun¹ and WU Jun^{1*}

1 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2 杭州九源基因公司, 杭州 310000

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 Hangzhou Jiuyuan Gene Engineering Co., Ltd., Hangzhou 310000, China

摘 要 为了延长 IFN $\alpha 2b$ 在血浆中的半衰期, 构建了编码 HSA 和 hIFN $\alpha 2b$ 的融合基因并在毕赤酵母中获得高效表达, 工程菌经 5L 发酵罐培养后获得的含融合蛋白的培养液经超滤浓缩、蓝色葡聚糖凝胶层析、疏水柱层析以及阴离子柱层析, 融合蛋白的纯度达到 95% 以上。该融合蛋白能与干扰素抗体和人血清白蛋白抗体结合, 并表现出与重组干扰素 $\alpha 2b$ 相似的抗病毒活性。以猕猴为动物模型, 分别从静脉和皮下单剂量给药, 给药浓度为 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 在 336h 后血浆中仍可检测到融合蛋白。其静脉注射的血浆半衰期为 101h, 皮下注射的半衰期为 68.2h。皮下注射的生物利用度为 67.9%。IFN $\alpha 2b$ 与 HSA 融合后, 明显的延长了血浆半衰期, 显现了其良好的临床应用前景。

关键词 干扰素, 人血清白蛋白, 融合蛋白, 半衰期, 毕赤酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0173-07

Abstract To reduce the serum clearance of interferon $\alpha 2b$, a chimeric gene encoding an human serum albumin (HSA) - human interferon $\alpha 2b$ (IFN $\alpha 2b$) fusion protein was overexpressed in *Pichia pastoris*. After fermentation in a 5L bioreactor, the fusion protein, capable of cross-reacting with anti-IFN α and anti-HSA antibody, was purified from the culture of the recombinant yeast by ultrafiltration, blue Sepharose affinity, phenyl hydrophobic interaction and Q ion exchange chromatography. Its IFN $\alpha 2b$ moiety exhibits antiviral activity similar to that of recombinant human IFN $\alpha 2b$. In Cynomolgus monkeys model, The fusion protein was detectable in plasma, even 336h after a single does of 90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ injection intravenously or subcutaneously. The elimination phase half-life of the fusion protein was 101h after intravenous injection and 68.2h after subcutaneous injection. Its Subcutaneous bioavailability was 67.9%. The enhanced pharmacokinetics of interferon $\alpha 2b$ fused to human serum albumin suggest its promising application in clinic medicine.

Key words IFN $\alpha 2b$, HSA, fusion protein, half-life, *Pichia pastoris*

作为抗病毒和免疫调节类药物, 许多重组的天然 IFN $\alpha 1b$ 等)以及重组的非天然结构的 I 型干扰素天然结构的 I 型 IFN α (IFN α , 包括 IFN $\alpha 2a$, IFN $\alpha 2b$, (IFN-con)已广泛用于临床, 并能有效的治疗多种人

类病毒性疾病和肿瘤^[1,2]。IFN α 能有效抑制乙型和丙型肝炎病毒的复制和降低患者血浆转氨酶^[3]。然而,作为一个小分子蛋白,IFN α 从血浆中清除的速度较快,其清除相半衰期为注射后的3~8h,24h后在血浆中就已检测不到IFN α 的存在,这对治疗是极为不利的^[4]。IFN用于肝炎治疗时,通常为每天一次或每周二次注射,但是在大部分治疗时间内,患者体内IFN浓度是低于有效浓度的,而另一方面,在给药后,血药浓度达到峰值时,其药物浓度又是远高于有效浓度,这就就会产生明显的副反应^[5]。为了增加IFN α 在体内的半衰期,现在广泛采用的是PEG修饰法,目前已有40kD左右PEG修饰的IFN α 2a (Pegasas[®], Roche)^[6,7]和12kD左右PEG修饰的IFN α 2b(PEG-Intron, Schering-Plough)^[8-10]应用于临床。这两类产品均可明显延长IFN α 在体内的半衰期。众所周知PEG修饰在蛋白分子的赖氨酸残基上,IFN α 含有10~11个赖氨酸,因此PEG修饰可以形成不同的异构体。这种众多异构体混合物造成不同的生理反应^[11]。虽然,利用定点基因突变的方法引入一个半胱氨酸(Q5C),并在此半胱氨酸上进行PEG修饰,从而可以实现单价定位修饰^[12]。但是,这种突变的IFN α 的免疫原性需要进一步进行人体评价。

人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)是人体血清中的主要成分,对维持体内渗透压和血浆体积起着至关重要的作用。人血清白蛋白是分子量为66.5kD的非糖基化蛋白,肾清除率非常低,体内半衰期为14~20d。它也是体内因子和药物转运的天然载体。因此,人血清白蛋白可望作为提高小分子蛋白在血液中的半衰期的载体。Yeh等发现,克鲁维氏酵母表达的HSA-CD4融合蛋白在以家兔为动物模型的实验后半衰期比单独的CD4延长了140倍^[14]。而克鲁维氏酵母表达的HSA-IFN α 的融合蛋白(albuferon)在猕猴体内的半衰期比单独的IFN α 延长了大约18倍^[15,16]。

本项研究在毕赤酵母中高效表达了含GGGS连接肽的HSA/IFN α 2b融合蛋白,经纯化后,对此融合蛋白的理化性质及药代特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:pGEM-T载体,购自Promega公司;pHIL-D2毕赤酵母表达载体,购自Invitrogen公司;E. coli DH5 α ,本室保存;Pichia pastoris GS115,购

自Invitrogen公司

1.1.2 培养基和添加剂:细菌培养基酵母抽提物,胰蛋白胨为Oxoid公司产品,细胞培养基为DMEM低糖培养基,购自GIBCO公司;胎牛血清为Hyclone产品;无氨基酸酵母氮源为GIBCO公司产品。

1.1.3 多克隆抗体:兔抗人HSA抗体购自Clontech公司,羊抗人IFN α 抗体为美国Peprotech公司产品,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗羊抗体购自北京欣经科公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建:从人胎肝cDNA文库(Clontech Co.)中得到HSA的全长cDNA,采用的两条引物分别为:5'-GCTTCGAAACCATGAAGTGGGTAA CCTTTATTTCCCT-3'和5'TAGGATCCACCACCACCAA GGCCTAAGGCAGCTTGACTTGC3';从PHA致敏的人淋巴细胞总RNA中用RT-PCR的方法得到IFN α 2b的成熟肽序列,采用的两条引物分别为:5'ATGGATCCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAG 3'和5'ATGAATTCCTTAGGGCTGGCA AGGTGGCG3'。然后,将HSA和IFN α 2b基因分别克隆到pGE-T载体(Invitrogen Co.)和pUC19中并进行序列测定。确证后将基因分别利用NSPVI/EcoRI和BamHI/EcoRI从载体上切下来。HSA的终止子被铰链肽GlyGlyGlyGlySer替代,再与IFN α 2b基因相连。为了将HSA与IFN以融合蛋白形式从毕赤酵母分泌表达,我们选择pHIL-D2质粒(简称pD2)作为载体。在该载体AOX启动子下游NspV与EcoRI位点间插入HSA/IFN基因,因pD2载体上有两个NspV位点,为了方便操作,pD2载体用ClaI酶切掉His4和3'AOX,自身连接后命名为pD3载体。HSA/IFN融合基因被克隆到pD3载体的NspV与EcoRI位点间,形成了pD3-HSA/IFN。用ScaI/EcoRI双酶切将包含有His4和3'AOX基因的DNA片段从pD2载体上切下后插入到pD3-HSA/IFN上同样位置,即获得包含有融合蛋白基因的表达载体pD2-HSA/IFN(见图1)。

1.2.2 质粒转化:提取pD2-HSA/IFN质粒约10 μ g,用NotI线性化后转化酵母菌GS115。在30 $^{\circ}$ C培养4~7d后,挑取His⁺克隆接种于25mL的BMGY培养基中,以250r/min的速度在30 $^{\circ}$ C摇床中振荡培养24h,然后加入0.5%的甲醇开始诱导,每12h诱导一次共诱导72h。用SDS-PAGE分析每个克隆是否有融合蛋白的表达,并且用Wish细胞检测培养物中IFN α 的抗病毒活性。

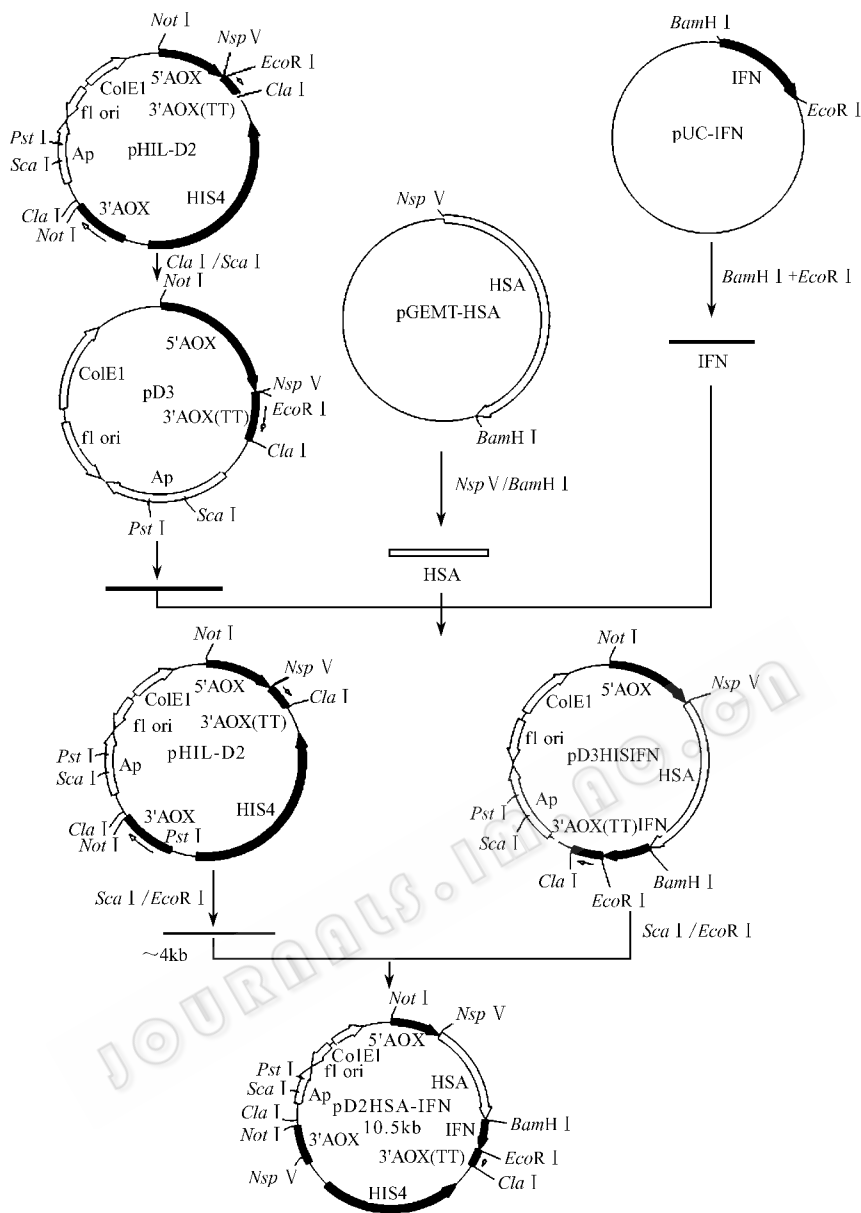


图1 pHIL-D2-HSA/IFN 载体的构建

Fig.1 Construction of pHIL-D2-HSA/IFN

1.2.3 工程酵母发酵:工程酵母接种 100mL YPD 培养基,摇床 30℃,250r/min 培养 24h。接种至装有 2.5L 基础培养基的 5L 发酵罐(B. Braun Corp. Germany)接种前用氨水将培养基 pH 调至 5.8。发酵过程控制温度为 30℃,溶氧始终大于 20% 饱和度,pH 值不高于 6.0。培养至甘油耗尽后,以 40mL/h 速度开始流加补料培养基继续培养,至密度 OD_{600} 值约为 120 时,以 20mL/h 的速度流加诱导培养基开始诱导表达,共诱导 96h。离心收集培养上清液用做融合蛋白的分析。

1.2.4 表达产物的纯化:将 5L 罐发酵培养物经 10000r/min 离心后,收取离心上清液,调到合适的 pH

值后,使用 MILLIPORE 超滤系统对发酵液进行超滤,使体积浓缩到 1/10 ~ 1/20。超滤后离心去除不溶物。使用亲和柱 BLUE-Sepharose 进行粗纯化。在中性 pH 值下上样,样品使用 2mol/L NaCl 洗脱;Blue Sepharose 柱洗脱峰加硫酸胺至 0.8mol/L 后在中性 pH 下过 phenyl-sepharose 柱,使用 20mmol/L PB 洗脱,收集约 0.3mol/L 硫酸胺的洗脱峰,稀释后在中性 pH 环境过 SOURCE Q 柱,使用 0 ~ 0.5mol/L NaCl 梯度洗脱目标峰。使用 Sepharose G25 柱对精纯化样品脱盐。样品保存于 10mmol/L PB 中。

1.2.5 表达产物的免疫印迹分析:取工程菌和对照菌(只带有 pHIL-D2 空载体)的培养上清液,2 μ g

纯化后的融合蛋白 2 μ g HSA 做 SDS-PAGE 后转移到 NC 膜上,封闭后与 HSA 抗体(1:1000)人 IFN α 抗体(1:1000)反应,室温振荡结合 2h,再与酶标二抗反应 1.5h,最后用 OPD 显色。

1.2.6 IFN 活性测定:根据 Rubinstein^[17]的 IFN α 测活方法,将对数生长期的 wish 细胞弃去培养液,用 PBS 洗 2 遍后胰酶消化,收集细胞,用含 10% 血清的 DMEM 将细胞稀释至(2.5~3.5) $\times 10^5$ 个/mL,加入 96 孔板中,每孔 100 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中培养 4~6h。在另一 96 孔板中倍比稀释 IFN 标准品及融合蛋白样品,每孔 100 μ L,将样品溶液按顺序加入到 wish 细胞的培养板中,37 $^{\circ}$ C 二氧化碳培养箱中继续培养 18~24h 后弃去培养液,每孔加入 100 μ L 病毒溶液继续培养 24h。显微镜下观察 IFN 标准孔中 50% 细胞出现病变点时,弃去培养液,每孔加入 50 μ L 染色液,室温放置 30min 后弃去染色液,用流水小心冲洗后吸干残留水分每孔加入 100 μ L 脱色液,室温放置 3~5min,570nm 测吸光值。

1.2.7 药物动力学试验:分别从皮下和静脉给猕猴单剂量注射 HSA/IFN α 2b,注射剂量为 90 μ g/kg。选取不同的时间点抽取猕猴的血液样品放入 EDTA 抗凝管中,离心后用 IFN α ELISA kits(Clontech.co)测定血浆中融合蛋白的量。

2 结果和讨论

2.1 结果

2.1.1 融合蛋白在毕赤酵母中的表达:从人胎肝总 RNA 库中扩增出 *hsa* 全长 cDNA。在扩增中,基因 3' 端终止子被一段编码连接肽 GlyGlyGlyGlySer 的基因替代。从人淋巴细胞中克隆到 IFN α 2b 的成熟肽 cDNA,融合到 rhHSA 基因的 3' 端。融合基因被整合到 pHIL-D2 载体的 AOX 启动子下游,获得的克隆用限制酶分析鉴定,结构正确(图 2)。融合基因序列分析与设计一致。构建正确的表达载体转化到毕赤酵母 GS115 中,挑选 His⁺ 阳性克隆进行表达筛选。培养上清进行 SDS-PAGE 电泳分析,筛选到一株表达株,命名为 GS115-HSA/IFN(图 3)。

2.1.2 HSA/IFN 制备:工程酵母的发酵培养主要经过三个步骤。第一阶段,菌体在 BF 基础培养基中生长,培养基的 pH 值和溶氧通过流加氨水和增加搅拌速度来控制。24h 后培养基中的碳源(甘油)耗尽,菌密度达到 60OD,进入第二阶段。开始以恒定速度流加甘油和微量盐,5~6h 后菌体量可以达到 120OD。第三阶段,停止补加甘油,开始流加甲醇诱

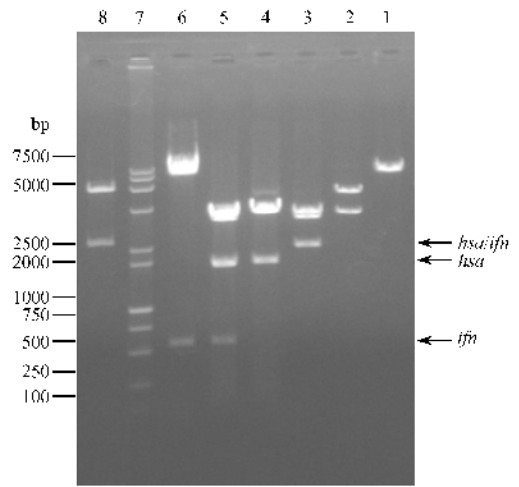


图 2 pHIL-D2-HSA/IFN 质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of pHIL-D2-HSA/IFN Plasmid

The plasmid was digested with *Eco*R I (Lane 1), *Nsp* V (Lane 2), *Nsp* V/*Eco*R I (Lane 3), *Nsp* V/*Bam*H I (Lane 4), *Nsp* V/*Bam*H I/*Eco*R I (Lane 5), *Bam*H I/*Eco*R I (Lane 6), *Not* I (Lane 8) and separated by electrophoresis on 1% agarose, molecular weight marker was loaded in lane 7, *ifn* α 2b, *hsa* and *hsa/ifn* α 2b fragment were marked with arrows.

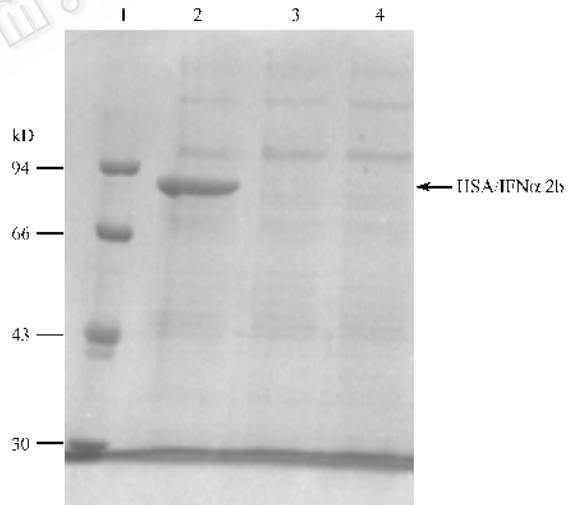


图 3 HSA/IFN α 2b 在 *P. pastoris* GS115 中的表达

Fig.3 Expression of HSA/IFN α 2b in *P. pastoris* GS115

1: molecular weight marker; 2: positive transformant; 3: negative transformant; 4: control (GS115 transfected with pHIL-D2 vector)

导融合蛋白的表达。如图 4 所示,随着诱导时间的增加融合蛋白的表达量也随之增加。最高表达出现在诱导后 48~72h。随诱导时间的延长杂蛋白的量也有明显增加,这可能是由于诱导后期,有部分酵母溶菌引起的。因而以诱导 60~72h 最佳。用 HSA 蛋白浓度标准品为外标,在同一胶上电泳,根据染色程度判定融合蛋白的表达水平大于 50mg/L。

发酵液中的融合蛋白的纯化经过超滤、蓝色葡

聚糖的亲水层析、疏水层析和阴离子交换层析四个步骤处理后,获得纯化蛋白(图 5)。纯化后样品经过凝胶 HPLC 和反相 HPLC 的鉴定,样品纯度可达 95% 以上。

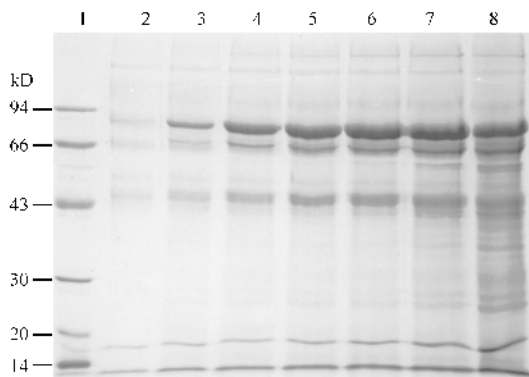


图 4 HSA/IFN $\alpha 2b$ 的 5L 发酵培养

Fig.4 HSA/IFN $\alpha 2b$ production in fermenter

Lane1 is molecular weight marker; Lane2-8 aliquots of 10 μ L -culture supernatant obtained at 0, 12, 24, 48, 60, 72, 96h after induction were subjected to SDS-PAGE.

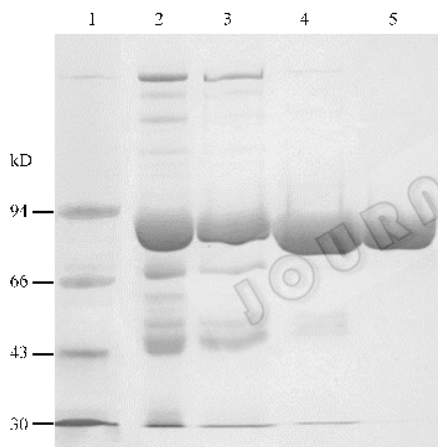


图 5 HSA/IFN $\alpha 2b$ 的纯化

Fig.5 Purification of HSA/IFN $\alpha 2b$

1: Molecular weight marker; 2: ultrafilter; 3: blue-sepharose affinity; 4: hydrophobic interaction chromatography; 5: source Q ion exchange.

2.1.3 抗病毒活性和免疫原性:融合蛋白表现出明显的 IFN 抗病毒活性,其抗病毒活性与剂量有关,为典型的“S”型。以 IFN $\alpha 2b$ 国家标准品为对照品,其 IFN $\alpha 2b$ 活性大约为 2×10^6 u/mg (图 6)。融合蛋白还用 IFN $\alpha 2b$ 和 HSA 特异性抗体进行了鉴定,免疫印迹结果显示表达产物与 HSA 抗体、IFN α 抗体均能发生特异性结合,进一步证实表达产物为 HSA/IFN α 的融合蛋白(图 7)。

2.1.4 药代动力学:猕猴静脉或皮下注射 90 μ g/kg HSA/IFN $\alpha 2b$ 融合蛋白后的血浆浓度变化如图 8 所示。静脉与皮下注射药物浓度—时间曲线下的总面

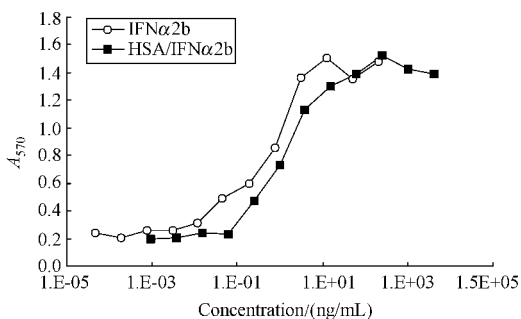


图 6 HSA/IFN $\alpha 2b$ 的抗病毒活性

Fig.6 Anti-virus activity of HSA/IFN $\alpha 2b$

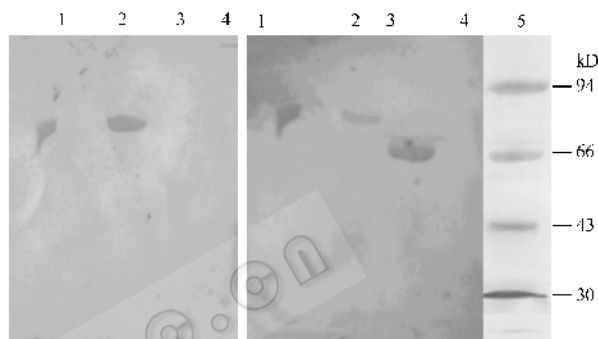


图 7 免疫学鉴定

Fig.7 Identification of the fusion protein with anti-HSA and anti-IFN $\alpha 2b$ antibody

1: Medium of GS115 (pHIL-D2-HSA/IFN); 2: purified HSA/IFN $\alpha 2b$; 3: HSA; 4: medium of GS115 (pHIL-D2); 5: molecular weight marker. The membrane was probed with anti-human IFN α antibody (left panel) and anti-HSA (right panel).

积 (AUC_{0-336h}) 分别为 18721.0 (ng·h)/mL 和 12718.4 (ng·h)/mL。皮下注射的生物利用率为 67.9%。皮下注射融合蛋白的吸收率缓慢,48h 后浓度到达峰值。静脉和皮下注射融合蛋白的半衰期分别为 68.2 和 101h,清除率分别为 4.7mL/(h/kg) 和 6.5mL/(h/kg)。

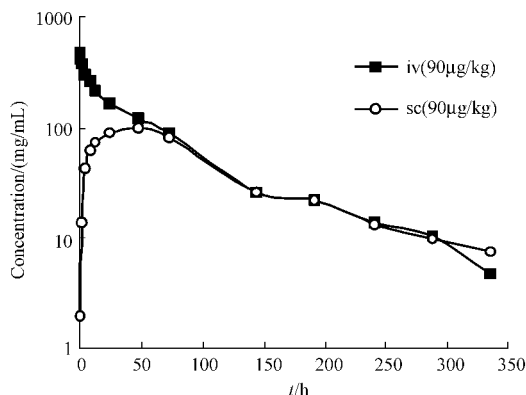


图 8 HSA/IFN $\alpha 2b$ 在猕猴中的药代动力学

Fig.8 Pharmacokinetics of HSA/IFN $\alpha 2b$ in Cynomolgus monkey

3 讨论

本研究在毕赤酵母中高效表达了 HSA/IFN α 2b 融合蛋白,该融合蛋白具有 IFN α 的抗病毒活性。其在猕猴血浆中的半衰期达 101h,约为普通 IFN α 2b 的 20 倍,PEG 化干扰素的 1.5~2 倍^[19],注射后 335h 仍可检测到 IFN。这种长效干扰素有望代替常规干扰素用于乙型、丙型肝炎及肿瘤等的治疗。其注射频率可以从常规干扰素的每天一次或每周 2 次减少到每二周一次。对于疗程长达 6~12 个月的病毒性肝炎等的治疗,这种注射频率的大幅度减少,将极大地方便患者。同时长效干扰素所提供的较为稳定的血药浓度也将提高疗效,降低副作用。

表达 HSA/IFN α 2b 的融合基因包括 HSA、GGGGS、hIFN α 2b 成熟肽的编码基因,其中 HSA 基因包括了其信号肽和前肽,用于在毕赤酵母中引导整个融合蛋白的分泌。实验表明,该信号肽可使融合蛋白高效分泌至培养基中(图 3、4)。蛋白 N-端序列分析表明,该信号肽能被完整切除,获得正确的 N-端序列(数据未列)。

HSA-CD4^[14]和 albuferon^[15]是利用克鲁维酵母表达系统,表达盒位于酵母质粒上,稳定性较差。本研究采用毕赤酵母表达系统,表达盒整合于酵母染色体上,提高了菌株的稳定性。毕赤酵母为甲醇利用型酵母,适于高密度发酵,已经用于约 400 种蛋白的表达^[18]。在强启动子 AOX 控制下,诱导前几乎没有目的蛋白的表达(图 4, 0h)。避免了在培养阶段目的蛋白渗漏表达对宿主菌的毒性问题。

为了减少 HSA 融合对 IFN 活性的影响,我们已在 HSA 与 IFN α 之间加入了一个柔性的连接肽(GGGGS)结构模拟显示 HSA 与 IFN α 为两个独立的结构域。纯化后的 HSA/IFN α 2b 融合蛋白比活性为 2×10^6 u/mg,同 IFN α 2b 相比,其相同克分子的比活性降低了约 10 倍,这种活性的降低可能与 HSA 融合后的位阻作用有关,这与文献报道的结果相似,albuferon 和 PEG 化的 IFN 活性分别下降了 20 倍^[15]和 4~14 倍^[6]。

HSA 融合明显延长了 IFN 的体内半衰期,但其机理还有待进一步研究。研究表明,动物注射 IFN α 后,IFN α 主要是以原型和分解产物的形式从尿中排泄^[20]。提示 IFN α 的体内代谢主要是通过肾小球的滤过作用完成的。这可能是由于 IFN α 分子量仅 19.4kD,其分子半径较小,易通过肾小球基底膜上的小孔。但与许多小分子化学药物可被肾小管重吸收

不同,IFN α 不具有脂溶性,因而几乎完全不能被肾小管重吸收,只能以原药形式排泄。同时由于肾小管中具有丰富的蛋白酶 D,因而原形 IFN 也可在肾小管中被降解后以降解产物形式从尿中排出。HSA 融合后增大了蛋白的分子半径,使其不宜被肾小球滤过,从而降低了原药从尿中排泄的速度。这可能是 HSA 融合延长 IFN 体内半衰期的主要原因。这种原药从肾排泄的减少不仅可延长药物的半衰期,而且可能降低干扰素治疗时的肾毒性。HSA 具有蛋白保护剂的作用,HSA 融合后是否还具有减少 IFN 在血浆中的降解的作用还有待进一步研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(4):1198-1205
- [2] Garwala SS, Kirkwood JM. Potential uses of interferon alpha 2 as adjuvant therapy in cancer. *Ann Surg Oncol*, 1995, **2**(4):365-371
- [3] Hu KQ, Vierling JM, Redeker AG. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat*, 2001, **8**(1):1-18
- [4] Thevenot T, Regimbeau C, Ratziu V, Leroy V, Opolon P, Poynard T. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C in naive patients: 1999 update. *J Viral Hepat*, 2001, **8**(1):48-62
- [5] Zhi J, Teller SB, Satoh H, Koss-Twardy SG, Luke DR. Influence of human serum albumin content in formulations on the bioequivalency of interferon alfa-2a given by subcutaneous injection in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*, 1995, **35**(3):281-284
- [6] Perry CM, Jarvis B. Peginterferon-alpha-2a (40 kD): a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs*, 2001, **61**(15):2263-2288
- [7] Pedder SC. Pegylation of interferon alfa: structural and pharmacokinetic properties. *Semin Liver Dis*, 2003, **23** Suppl 1:19-22
- [8] Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R *et al*. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. hepatitis C intervention therapy group. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, **68**(5):556-567
- [9] Kamal SM, El Tawil AA, Nakano T *et al*. Peginterferon {alpha} 2b and ribavirin therapy in chronic hepatitis C genotype 4: impact of treatment duration and viral kinetics on sustained virological response. *Gut*, 2005, **54**(6):858-866
- [10] Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA *et al*. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem*, 2001, **12**(2):195-202
- [11] Monkars SP, Ma Y, Aglione A *et al*. Positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a: isolation, characterization, and

- [12] Rosendahl MS , Doherty DH , Smith DJ , Carlson SJ , Chlipala EA , Cox GN. A long-acting , highly potent interferon alpha-2 conjugate created using site-specific PEGylation. *Bioconjug Chem* , 2005 , **16** (1) 200 - 207
- [13] Chuang VT , Otagiri M. How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin ? *Pharm Res .* , 2002 , **19** (10) : 1458 - 1464
- [14] Yeh P , Landais D , Lemaitre M *et al.* Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy : biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1992 , **89** (5) : 1904 - 1908
- [15] Osborn BL , Olsen HS , Nardelli B *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* , 2002 , **303** (2) 540 - 548
- [16] Sung C , Nardelli B , LaFleur DW *et al.* An IFN-beta-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates. *J Interferon Cytokine Res* , 2003 , **23** (1) 25 - 36
- [17] Rubinstein S , Familletti PC , Pestka S. Convenient assay for interferons. *J Virol* , 1981 , **37** (2) : 755 - 758
- [18] Cereghino GP , Cereghino JL , Ilgen C , Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* , 2002 , **13** (4) 329 - 332
- [19] Rajender Reddy K , Modi MW , Pedder S. Use of peginterferon alfa-2a (40kD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C. *Adv Drug Deliv Rev* , 2002 , **54** (4) 571 - 586
- [20] Radwanski E , Perentesis G , Jacobs S. Pharmacokinetics of interferon alpha-2b in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* , 1987 , **27** (5) : 432 - 435