

人血清白蛋白和人干扰素 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 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 2b 在血浆中的半衰期, 构建了编码 HSA 和 hIFN 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 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 μ g/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 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 2b, a chimeric gene encoding an human serum albumin (HSA) - human interferon 2b (IFN 2b) fusion protein was overexpressed in *Pichia pastoris*. After fermentation in a 5L bioreactor, the fusion protein, capable of cross-reacting with anti-IFN 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 2b moiety exhibits antiviral activity similar to that of recombinant human IFN 2b. In Cynomolgus monkeys model, The fusion protein was detectable in plasma, even 336h after a single does of 90 μ g/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 2b fused to human serum albumin suggest its promising application in clinic medicine.

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

作为抗病毒和免疫调节类药物, 许多重组的天然结构的 I 型 IFN (IFN, 包括 IFN 2a, IFN 2b,

Received: October 26, 2005; Accepted: December 20, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948825; E-mail: Junwu1969@163.com

IFN 1b 等) 以及重组的非天然结构的 I 型干扰素 (IFN- α) 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 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 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 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, 这就会产生明显的副作用^[5]。为了增加 IFN 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 2a (Pegasas, Roche)^[6,7] 和 12kD 左右 PEG 修饰的 IFN 2b (PEG Intron, Schering-Plough)^[8-10] 应用于临床。这两类产品均可明显延长 IFN 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 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 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中半衰期比单独的 CD4 延长了 140 倍^[14]。而克鲁维氏酵母表达的 HSA-IFN 的融合蛋白 (albuferon) 在猕猴体内的半衰期比单独的 IFN 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 GGGGS 连接肽的 HSA/IFN 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, 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 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'-GCTTCGAAACCATGAA GTGGGTAA 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 2b 的成熟肽序列, 采用的两条引物分别为: 5'-ATGGATCCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAG-3' 和 5'-ATGAATCTTAGGGCTGGGCA AGGTGGCG-3'。然后, 将 HSA 和 IFN 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 *NSPV*/*EcoR* 和 *BamH*/*EcoR* 从载体上切下来。HSA 的终止子被铰链肽 GyGyGyGySer 替代, 再与 IFN 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 *Nsp* 与 *EcoR* 位点间插入 HSA/IFN 基因, 因 pD2 载体上有两个 *Nsp* 位点, 为了方便操作, pD2 载体用 *Cla* 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 *Nsp* 与 *EcoR* 位点间, 形成了 pD3-HSA/IFN。用 *Sca*/*EcoR* 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 *Not* 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 的抗病毒活性。

1.2.3 工程酵母发酵: 工程酵母接种 100mL YPD 培养基, 摇床 30 $^{\circ}$ C, 250r/min 培养 24h。接种至装

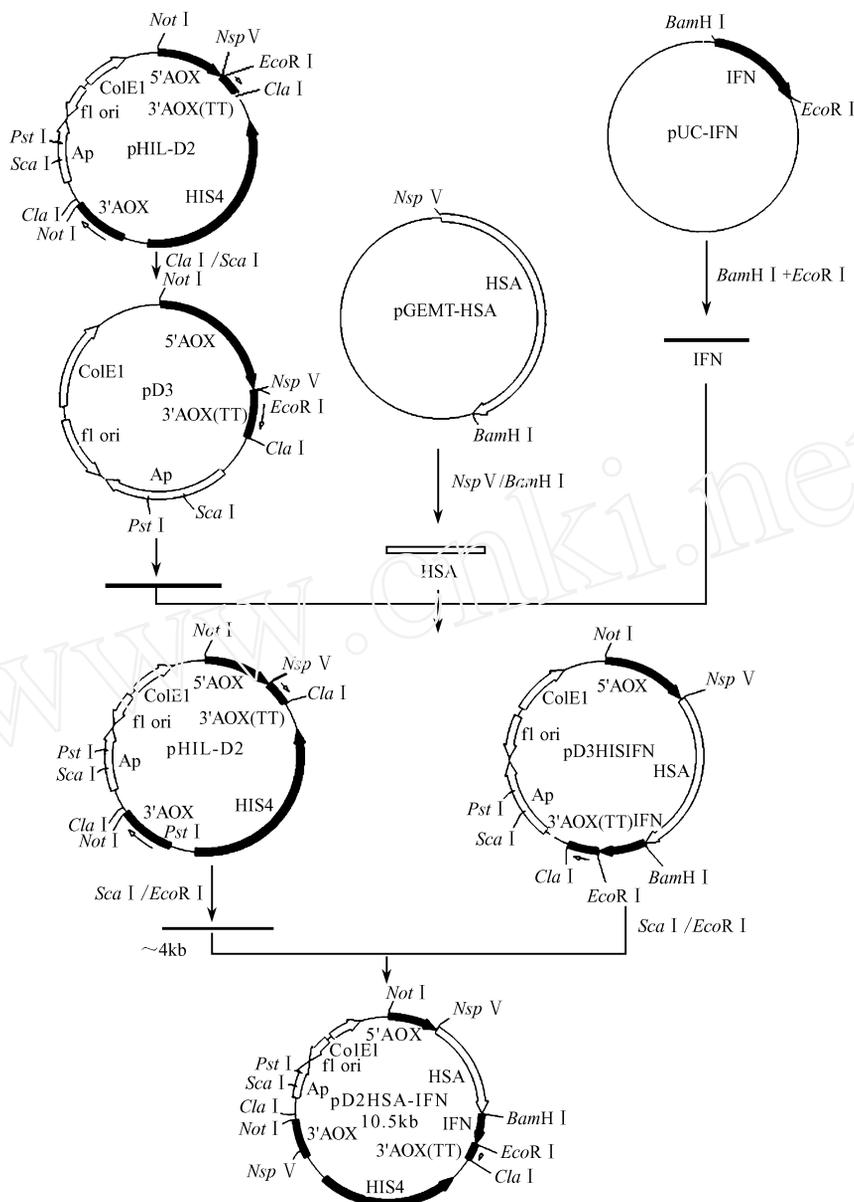


图 1 pHI-D2-HSA/IFN 载体的构建

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

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 pHI-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 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 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 $(2.5 \sim 3.5) \times 10^5$ 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 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 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 GyGyGyGySer 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 60 OD, 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 120 OD。第三阶段, 停止补加甘油, 开始流加甲醇诱导融合蛋白的表达。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

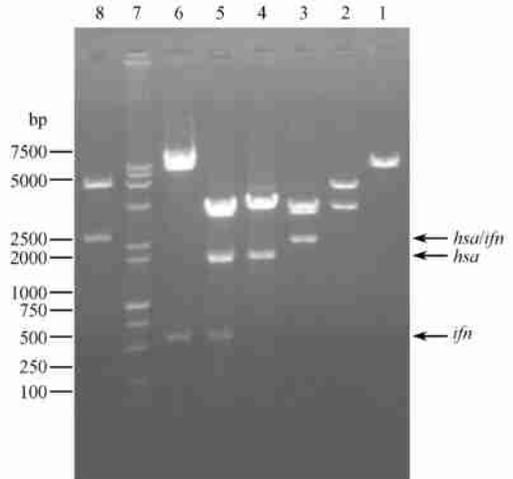


图 2 pHL-D2-HSA/IFN 质粒的鉴定

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

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

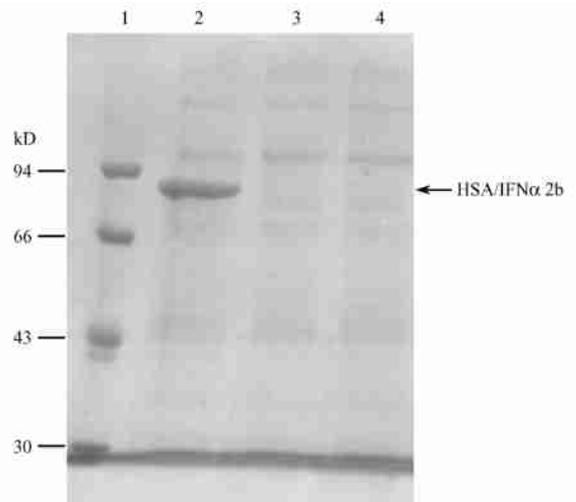


图 3 HSA/IFN 2b 在 *P. pastoris* GS115 中的表达

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

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

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、蓝色葡聚糖的亲和层析、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。

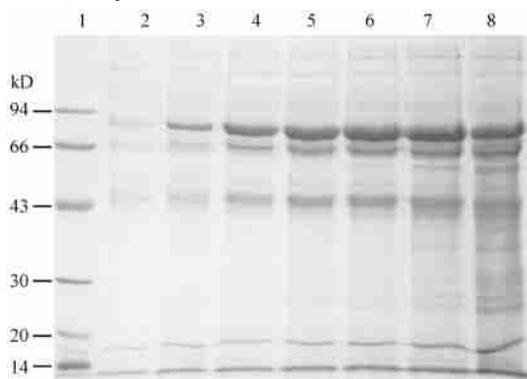


图 4 HSA/IFN 2b 的 5L 发酵培养

Fig. 4 HSA/IFN 2b production in fermentor

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

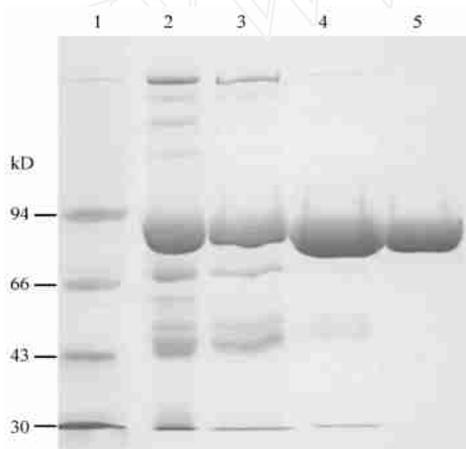


图 5 HSA/IFN 2b 的纯化

Fig. 5 Purification of HSA/IFN 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 2b 国家标准品为对照品，其 IFN 2b 活性大约为 2×10^6 u/mg (图 6)。融合蛋白还用 IFN 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 抗体均能发生特异性结合，进一步证实表达产物为 HSA/IFN 的融合蛋白 (图 7)。

2.1.4 药代动力学：猕猴静脉或皮下注射 90µg/kg HSA/IFN 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

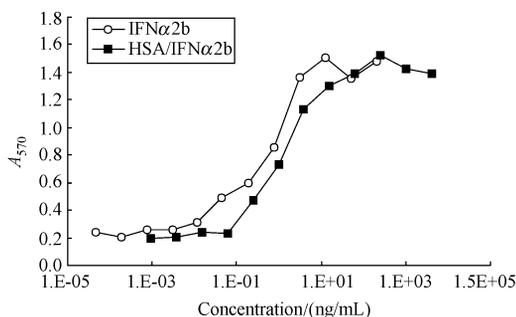


图 6 HSA/IFN 2b 的抗病毒活性

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

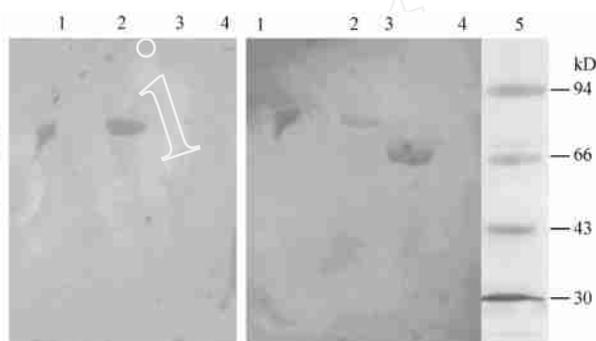


图 7 免疫学鉴定

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

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

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)。

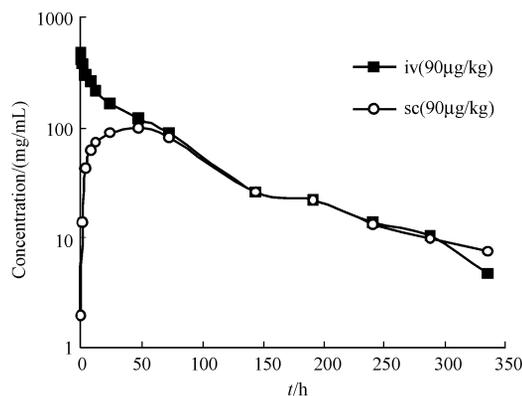


图 8 HSA/IFN 2b 在猕猴中的药代动力学

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

3 讨论

本研究在毕赤酵母中高效表达了 HSA/IFN 2b 融合蛋白, 该融合蛋白具有 IFN 的抗病毒活性。其在猕猴血浆中的半衰期达 101h, 约为普通 IFN 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 2b 的融合基因包括 HSA、GGGGS、hIFN 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 之间加入了一个柔性的连接肽 (GGGGS), 结构模拟显示 HSA 与 IFN 为两个独立的结构域。纯化后的 HSA/IFN 2b 融合蛋白比活性为 2×10^6 u/mg, 同 IFN 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 后, IFN 主要是以原型和分解产物的形式从尿中排泄^[20]。提示 IFN 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 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 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] Gatterman 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, Ratziv V, Leroy V, Opolon P, Bynard 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] Que 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] Monkarsh SP, Ma Y, Aglione A *et al.* Positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a: isolation, characterization, and biological activity. *Anal Biochem*, 1997, **247** (2): 434 - 440
- [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 alpha-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

科学出版社生命科学编辑部新书推介

《微生物学教学与科学研究进展》

夏立秋 陈则 主编 ISBN 7-03-016260-9 定价：56.00元 出版时间：2006-01

本书是根据 2003 年 11 月在长沙由中国微生物学会主办的“第九届全国微生物学教学和科研及成果产业化研讨会”论文编写而成的，涉及面较广，有一定的深度。本书从不同的角度展示了我国近期微生物学的教学改革最新成果，对微生物学前沿理论教学、新技术实验教学、现代教学方法与 21 世纪教材研究及设计、微生物学高素质创新人才的培养模式等内容进行了深入细致的探讨。书中论文特别对我国近几年微生物科学的应用基础理论与应用技术研究方面的成果进行了总结和交流，展示了微生物科学技术研究的最新进展，其研究内容涉及分子病毒学、生态修复工程菌、海洋微生物、微生物农药、新型医药微生物及油藏调剖菌研究的新领域。本书是一本集微生物教学、科研于一体，信息丰富，位于学科前沿的重要参考书。本书可供高等院校生物类专业教师、研究生和本科生及从事微生物科学技术研究的科研人员、管理人员参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社 联系人：阮芯

联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目，010-64012501