

УДК 573.6.086.83:577.21]:[615.373.3+615.277]

А. В. Карабельский, М. В. Падкина

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ИНТЕРФЕРОНЫ-АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

В последние годы рынок лекарственных средств, произведенных с помощью методов биотехнологии, неуклонно растет. Фармакологическая биотехнология использует микроорганизмы, макроорганизмы и культуры клеток для создания новых лекарственных средств, повышения эффективности уже существующих лекарственных средств и для снижения стоимости производства лекарств. Основную массу рекомбинантных молекул составляют: цитокины, ферменты, гормоны, моноклональные антитела, вакцины, факторы свертывания крови и др. Использование биотехнологии позволяет получать рекомбинантные белки, которые не отличаются от природных молекул, что значительно снижает риск возникновения побочных реакций при их применении.

Интерфероны (ИНФ) — это группа биологически активных пептидов или гликопротеидов, синтезируемых клеткой в ходе защитной реакции в ответ на вирусное воздействие. Благодаря своим антипролиферативным свойствам и способности подавлять репликацию вирусов, ИНФ- α активно используют в терапии гепатита, стоматита, лейкемии, меланомы и саркомы. Кроме того, не исключается возможность применения ИНФ и в лечении ВИЧ-инфекций.

Развитие методов клонирования ДНК послужило основой получения и исследования генно-инженерных препаратов. К настоящему времени создано большое количество систем гетерологичной экспрессии, обеспечивающих синтез белков человека, в том числе и интерферонов. Практически все существующие на рынке препараты рекомбинантных ИНФ- α человека созданы на основе *Escherichia coli*. Длительное применение рекомбинантных ИНФ бактериального происхождения сопровождается побочными эффектами. Поэтому особенно актуальной на сегодняшний день является проблема улучшения фармакологических свойств рекомбинантных интерферонов.

Пути повышения клинической эффективности лекарственного вещества могут быть различными: это изменение его химической структуры, соединение с другими препаратами, способными усилить или наоборот ослабить действие основного препарата. Модификация белков или пептидов является проблематичной, поскольку изменение их структуры может или ослабить биологические свойства, или способствовать появлению побочных эффектов в процессе лечения (например, такие препараты могут быть иммуногенными).

В настоящее время основными способами повышения эффективности действия лекарственных препаратов являются пегилирование (ковалентное присоединение к белку молекулы полиэтиленгликоля, ПЭГ) и получение «химерных» белков (гибридных молекул), состоящих из альбумина человека и лекарственного белка.

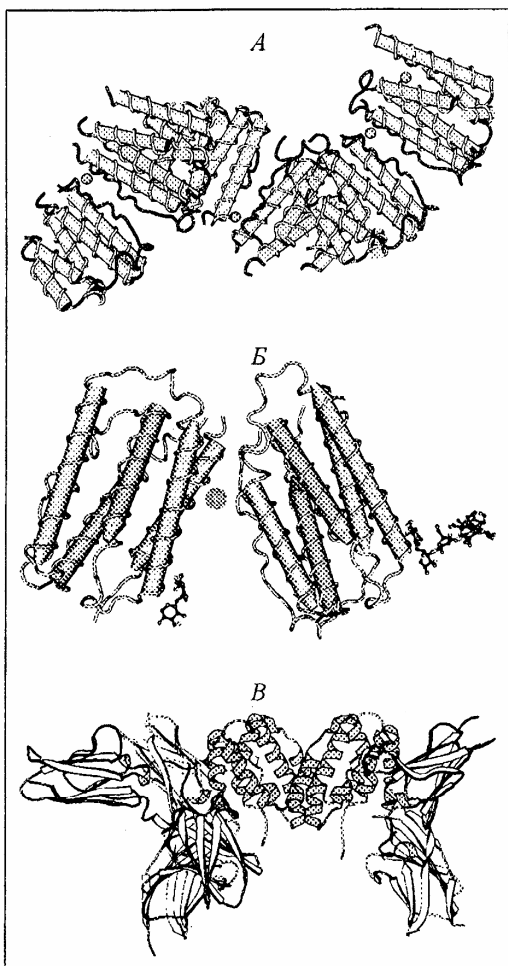


Рис. 1. Пространственная структура молекул интерферонов.

A — α -интерферон (мономеры),

[http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:1RH2Recombinant_Human_Interferon-Alpha_2b];

B — β -интерферон (мономеры),

[http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:1AU1_Human_Interferon-Beta01.png];

V — γ -интерферон (гомодимер),

[http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2004/warwick_robinson/interferon%20complex.jpg].

Действие системы интерферонов направлено, прежде всего, на распознавание и элиминацию чужеродной генетической информации. Многообразие обнаруживаемых и изученных к настоящему времени физиологических функций ИНФ также указывает на их контрольно-регуляторную роль в сохранении гомеостаза. Основные эффекты ИНФ можно подразделить на противовирусные, антимикробные, противоопухолевые и иммуномодулирующие [1].

Альфа-интерферон. В настоящее время известно три класса интерферонов: лейкоцитарный, или α -интерферон, фибробластный, или β -интерферон, и иммунный, или γ -интерферон (рис. 1).

Благодаря относительному сходству функций и аминокислотных последовательностей ИНФ- α и ИНФ- β объединены в одно семейство интерферонов I типа, тогда как ИНФ- γ выделяют в отдельное семейство интерферонов II типа [37, 38]. Нативный ИНФ- γ человека существует в растворе в виде гомодимера, в то время как активными формами ИНФ I типа являются мономеры [42]. Однако, несмотря на то, что для ИНФ I типа не доказано существование димеров в растворе, нельзя исключить, что димеризация может происходить при взаимодействии этих белков с рецепторами [29].

ИНФ- α синтезируется лейкоцитами (B-, T-лимфоцитами, макрофагами) после воздействия на них митогенов, вирусов, чужеродных и опухолевых клеток. В коротком плече 9-й хромосомы человека находится кластер структурных генов интерферонов I типа, который включает 13 генов ИНФ- α (*INFA 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 21*) [21, 22]. Различные ИНФ- α на 80 % идентичны между собой [36]. Для некоторых генов (*INFA1, INFA2, INFA4*) обнаружено явление полиморфизма, поэтому существует два варианта ИНФ- $\alpha 1$ (a, b), три варианта ИНФ- $\alpha 2$ (a, b, c) и два варианта ИНФ- $\alpha 4$ (a, b) [27, 28].

Недавние исследования показали, что спектр активностей ИНФ- α у представителей семейства может различаться. Некоторые ИНФ- α (ИНФ- $\alpha 8$, ИНФ- $\alpha 17$) оказались значительно более эффективными в лечении ряда вирусных заболеваний, чем ИНФ- $\alpha 2b$ [18, 23].

Экспрессия ИНФ- α осуществляется на самых ранних стадиях инфекции и предшествует экспрессии большинства других цитокинов. ИНФ- α играет ключевую роль в запуске раннего иммунного ответа, прямо или косвенно действует на многие клеточные функции в процессе иммунного ответа, индуцирует продукцию важнейших цитокинов, таких, как ИНФ- γ и ИЛ-2, обеспечивает связь врожденного и приобретенного иммунитета и принимает непосредственное участие в создании иммунологической памяти.

В настоящее время ИНФ- α является важным компонентом фармакотерапии в лечении ряда вирусных, онкологических и аутоиммунных заболеваний [12, 40]. Антипролиферативные, противовирусные и иммуномодулирующие свойства ИНФ- α обеспечили его использование в клинической практике. Наиболее успешно ИНФ- α применяется в терапии гепатита С (HCV), энцефаломиокардита (ЕМС), везикулярного стоматита (VSV) и лимфатического хориоменингита (LCMV). ИНФ- α используют в лечении некоторых герпетических инфекций, а также хронического гепатита В [14, 25, 45]. Обсуждается возможность использования препаратов интерферона в терапии больных ВИЧ [10, 41].

Развитие генной инженерии позволило клонировать и экспрессировать гены интерферонов в эукариотических и прокариотических системах. Для получения больших количеств ИНФ- α были созданы штаммы-продуценты активного белка (ИНФ- α 2а и ИНФ- α 2b) на основе микроорганизмов. В настоящее время на рынке существуют несколько препаратов рекомбинантного ИНФ- α 2, полученного из *E. coli* («Берофор», *Boehringer ingelheim*, Германия; Интрон-А, *Schering-Plough*, США; «Реаферон», *Вектор-фарм*, Россия).

Рекombинантный ИНФ- α 2 по своим функциям полностью соответствует природному, однако короткий период полужизни белка в кровяном русле и в связи с этим частые инъекции препарата, сопровождающиеся побочными эффектами, показали целесообразность модификации молекулы интерферона для улучшения его фармакокинетических и фармакодинамических свойств. Сейчас работы в этой области ведутся во многих лабораториях мира, и наиболее актуальными являются исследования, посвященные созданию химерных молекул, содержащих наряду с активным пептидом последовательности альбумина и полиэтиленгликоля.

ПЭГ-интерферон. Одним из путей повышения эффективности лекарственных препаратов белковой структуры является химическая модификация их молекулы, достигаемая соединением нативной молекулы с полиэтиленгликолем (ПЭГ) (данный процесс получил название «пегилирование») (рис. 2) [22]. Подобная химическая модификация фармакологических препаратов пептидной структуры направлена на повышение периода их полужизни, улучшение их переносимости, снижение иммуногенности, и как следствие, на значительное повышение качества жизни пациентов в процессе лечения [39, 43, 49, 50].

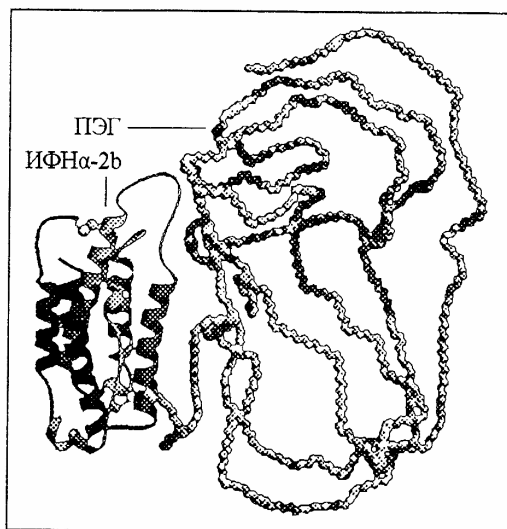


Рис. 2. Пространственная структура химерной молекулы «ИНФ- α 2b-ПЭГ» (ИНФ- α 2b, Schering Plough, США)

[<http://www.journalonko.de/bilder/0802/ph02.jpg>].

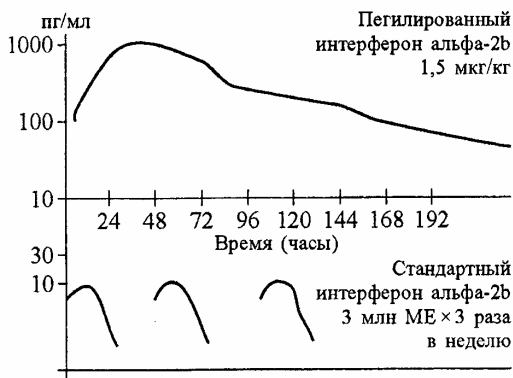


Рис. 3. Изменение концентраций стандартного (природного) и пегилированного ИНФ- α 2b в крови [<http://medi.ru/doc/08h1301.htm>].

В настоящее время на рынке представлен препарат рекомбинантного ИНФ- α 2b, «сплитого» с молекулой ПЭГ. Данный препарат уже прошел все необходимые клинические испытания и зарегистрирован к применению во всех ведущих европейских странах (в том числе и в России) и США под коммерческим названием ПЭГ-Интрон (Schering Plough, США, 2001) и рекомендован для использования в лечении гепатита С. На рис. 3 представлены основные параметры фармакокинетики двух препаратов: природного ИНФ- α 2b и пегилированного конъюгата ПЭГ-ИНФ- α 2b (ПЭГ-Интрон) при терапии гепатита С [8].

Очевидно, что ПЭГ-ИНФ- α 2b имеет значительно лучший биологический профиль, нежели ИНФ- α 2b; это выражается существенным повышением периода полужизни пегилированного аналога. Присоединение относительно небольшой молекулы ПЭГ молекулярной массой 12 кДа к ИНФ в опытах *in vivo* продемонстрировало, что максимальная концентрация белка при использовании такого конъюгата достигается через 15–44 ч и сохраняется в течение 48–72 ч. Таким образом, период «эффективной» полужизни препарата составляет в среднем около 40 ч. Замедление выведения (клиренса) ПЭГ-ИНФ- α 2b из плазмы обеспечивает циркуляцию его в крови в течение недели. Именно такие фармакокинетические и фармакодинамические параметры препарата обеспечивают заведомо более высокую эффективность ПЭГ-ИНФ- α 2b по сравнению со стандартным ИНФ- α 2b [8, 24, 43, 49].

Таким образом, для ПЭГ-ИНФ- α 2b характерен баланс между противовирусной активностью и длительным периодом полувыведения, позволяющим назначать препарат один раз в неделю, а также эффективно выводить метаболиты ПЭГ из организма [2].

ПЭГ-модифицированные пептидные препараты имеют на сегодняшний день большие перспективы при лечении таких заболеваний, как ферментные дефициты, лейкемия, хронические воспалительные заболевания, онкология, хронические вирусные инфекции, сердечно-сосудистая патология. Пегилированные лекарственные препараты пептидной структуры обладают рядом весомых и несомненных преимуществ по сравнению с природными аналогами: усиление биологической активности, удлинение периода «эффективной» полужизни, замедление выведения, отсутствие пиков плазменной/тканевой концентрации, понижение токсичности и иммуногенности [8, 30]. Кроме того, было показано, что ПЭГ-модифицированные ИНФ- α 2a и ИНФ- α 2b не индуцируют развитие депрессии, которая является следствием инъекции ИНФ [31].

Основным недостатком ПЭГ-конъюгированных пептидов является возможное уменьшение активности белка, связанное с выбором «неправильного» размера или структуры ПЭГ; с этой же причиной может быть связано и возможное удлинение времени элиминации пептида [4]. В некоторых случаях терапия гепатита С ПЭГ-интроном не дает ожидаемых результатов, что делает необходимым поиск новых модифицированных препаратов [7].

Химерный белок «Альбумин-интерферон». Многочисленные эксперименты по улучшению фармакокинетических свойств ИНФ- α привели к созданию химерного белка, в котором к молекуле ИНФ «пришита» молекула альбумина человека — основного

компонента плазмы крови. Сывороточный альбумин человека (HSA) — это глобулярный белок, состоящий из 585 АК и имеющий молекулярную массу около 66 кДа. Период его полужизни примерно 19 дней. Альбумин обладает рядом ценных свойств, главным из которых является его способность связывать и транспортировать эндо- и экзогенные лиганды (в том числе и белки). Таким образом, он играет роль естественного стабилизатора и переносчика белков плазмы крови. Ранее альбумин уже использовали в экспериментах по созданию химерных белков, применяемых в терапии («альбумин-хирудин», «альбумин-CD4»). Все эти белки имели длительный период полужизни и обладали высокой стабильностью [47, 48]. Создание активного препарата, «сшитого» с альбумином ИНФ- α , позволит скомбинировать высокую иммунологическую активность интерферона с фармакокинетическими преимуществами альбумина.

Функциональные отличия между видами интерферона-альфа до конца не установлены. Известно лишь, что некоторые ИНФ- α могут обладать большей противовирусной активностью по сравнению с другими (см. ранее). Поэтому на сегодняшний день получение рекомбинантных препаратов различных видов ИНФ- α и их модифицированных форм является особенно актуальным.

К настоящему времени было создано 2 варианта гибридного белка, состоящего из альбумина человека и ИНФ- α .

Корпорация Schering Plough сообщила о создании штамма дрожжей *Kluyveromyces lactis* продуцента химерного белка «Альбуферона», иммунологически-активным компонентом которого является ИНФ- α 2b (Intron-A; Schering Plough Corp., Kenilworth, NJ) [34, 46].

В лаборатории биохимической генетики БиНИИ СпбГУ был получен химерный белок на основе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, состоящий из альбумина человека и ИНФ- α 16 («Альбурон 16») [2, 3].

Большая часть работ по созданию продуцентов гетерологичных белков проведена на *Escherichia coli*. Однако, так как *E. coli* является прокариотическим условно-патогенным микроорганизмом, то для получения медицинских препаратов требуется высокая степень очистки гетерологичного белка. Альтернативой может быть создание эукариотических систем экспрессии на основе дрожжей, которые сочетают простоту работы с прокариотическими системами с высоким уровнем синтеза гетерологичного белка. Химерный белок Альбуферон- β (HSA-ИНФ- β) был получен из культуры клеток млекопитающих, а химерный белок Альбуферон (HSA-ИНФ- α 2b) — из дрожжей *Kluyveromyces lactis* [34, 46]. Нецелесообразность использования штаммов-продуцентов на основе дрожжей *K. lactis* заключается в гипергликозилировании секретируемых рекомбинантных белков, что может сопровождаться практически полной потерей биологической активности [19, 33]. Кроме того, для трансформации клеток *K. lactis* используют репликативные плазмиды, которые содержат в своем составе ген устойчивости к генетицину (*G418*), что может быть потенциально опасным в связи с вероятностью горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам [20].

Химерный белок Альбурон 16 (альбумин-ИНФ- α 16) был получен из метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Данный вид дрожжей характеризуется высокой продуктивностью и способностью секретировать рекомбинантный белок в культуральную среду. Использование интегративных плазмид позволяет получать стабильные штаммы дрожжей, не содержащие бактериальную ДНК и генов устойчивости к антибиотикам [15, 16, 32]. Кроме того, белки, секретируемые дрожжами *P. pastoris*, не являются иммуногенными и сохраняют свою биологическую активность за счет корректной посттрансляционной модификации [6, 11, 17].

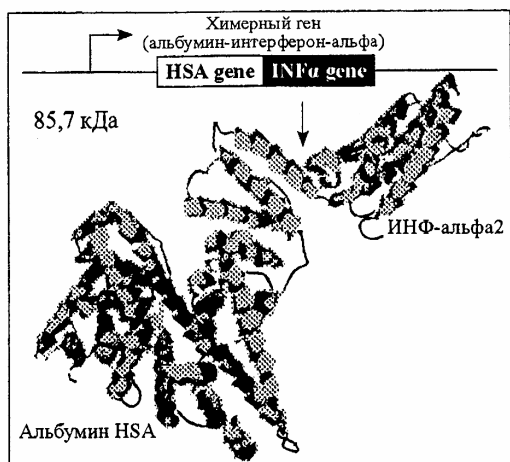


Рис. 4. Возможная пространственная структура химерного белка «HSA-ИНФ- α 2» [http://www.natap.org/2005/AASLD/aasld_38.htm].

что Альбуферон ингибирует пролиферацию клеток и имеет чуть более низкую противовирусную активность, чем ИНФ- α 2. Однако сниженный уровень активности Альбуферона *in vitro* компенсируется его улучшенными фармакокинетическими свойствами [34].

Химерный белок Альбуферон обладает улучшенными фармакологическими характеристиками, прежде всего, за счет длительного периода полужизни, замедленного клиренса и высокой стабильности в плазме крови. Фармакокинетический анализ *in vivo* показал, что выведение Альбуферона (клиренс) начинается преимущественно на 10-й день после его инъекции. При подкожном введении препарата период полужизни Альбуферона составляет около 90 ч, что в 18 раз больше, чем у ИНФ- α 2, и в 3 раза больше, чем у «ПЭГ-Интрона».

Фармакокинетические преимущества Альбуферона положительным образом сказываются на его противовирусной и антипролиферативной активностях. В качестве маркера антивирусной активности Альбуферона *in vivo* использовали ИНФ- α -зависимое увеличение концентрации мРНК 2'-5'-олигоденилатсинтазы (2'-5'-ОАС) [34]. Этот фермент активирует латентную эндорибонуклеазу (РНКазу L), разрушающую вирусную РНК [34].

Показано, что однократная инъекция Альбуферона резко увеличивает концентрацию 2'-5'-ОАС мРНК и поддерживает ее примерно на одном уровне в течение 8 дней, в то время как антивирусная активность ИНФ- α 2 сохраняется лишь в течение 24 ч после инъекции, а активность ПЭГ-Интрона наблюдали в течение 120 ч [34].

Сходные результаты были получены при исследовании активности химерного белка Альбуферона- β (т. е. химерного белка, состоящего из альбумина и ИНФ- β человека) на приматах. В частности было показано, что период его полужизни около 36–40 ч, что в 5 раз больше, чем у нативного ИНФ- β . Однократное введение Альбуферона- β повышает концентрацию неоптерина (индикатора клеточного иммунитета) в плазме крови, а также активирует продукцию 2'-5'-ОАС [46].

Результаты клинических исследований фармакологических свойств Альбуферона- α на приматах предполагали, что период полужизни белка в плазме крови человека будет составлять от 90 до 288 ч. Недавно проведенные клинические испытания химерного белка на больных хроническим гепатитом С подтвердили это предположение. Химерный белок имел замедленный клиренс, период полужизни около 159 ч и устойчивую

Альбуферон (Schering Plough) — белок с молекулярной массой около 85,7 кДа. К С-концу рекомбинантного альбумина с помощью методов генной инженерии «пришит» N-конец рекомбинантного ИНФ- α 2 (рис. 4). Альбуферон в настоящее время проходит последние стадии клинических испытаний, которые продемонстрировали значительные его преимущества в сравнении с рекомбинантным ИНФ- α 2b [13].

Для выявления противовирусных и антипролиферативных свойств белка *in vitro* проводили сравнение активности Альбуферона и ИНФ- α 2 на нескольких клеточных линиях. Для изучения фармакокинетических и фармакодинамических свойств химерного белка *in vivo* исследования проводили на приматах.

Результаты анализа *in vitro* показали,

противовирусную активность. При этом интервал между инъекциями лекарства составлял от 2 до 4 недель [9]. Подобная терапия невозможна даже при использовании модифицированных пегилированных препаратов.

Известно, что терапия гепатита С ИНФ- α сопровождается значительными негативными побочными эффектами [35]. Было показано, что инъекции ИНФ- $\alpha 2$ приводят к изменениям в системе метаболизма серотонина и снижению его уровня в мозге, что часто приводит к тяжелой депрессии [44]. Кроме того, интенсивная терапия ИНФ иногда приводит к развитию анемии [26]. Таким образом, более редкое введение модифицированного препарата ИНФ позволяет снизить риск появления побочных эффектов действия ИНФ и тем самым значительно упростить процесс лечения [34].

Альбурон 16 (ЛБГ БиНИИ СПбГУ)— белок с молекулярной массой около 86 кДа, в котором к С-концу рекомбинантного альбумина «пришит» N-конец рекомбинантного ИНФ- $\alpha 16$. Используемый способ конструирования вектора, а именно отсутствие линкера между геном *HSA* и *INFA16* и расположение гена *HSA* со стороны 5'-конца экспрессионной кассеты, позволило получить штамм дрожжей *Pichia pastoris*, секретирующий около 25 мг/л биологически активного рекомбинантного белка [2, 3].

Ранее в лаборатории биохимической генетики БиНИИ был создан штамм дрожжей *Pichia pastoris*, секретирующий рекомбинантный ИНФ- $\alpha 16$ человека [5]. Доклинические испытания рекомбинантного ИНФ- $\alpha 16$ человека на острую и хроническую токсичность, проведенные в Научно-исследовательском испытательном центре государственного научно-исследовательского института военной медицины МО РФ (Санкт-Петербург), показали, что применение этого препарата, несмотря на присутствие примесных дрожжевых белков, не сопровождается побочными эффектами, наблюдаемыми при использовании Реаферона (ИНФ- $\alpha 2$ человека бактериального происхождения), что подтверждает преимущества дрожжей как продуцентов белков человека медицинского назначения. Кроме того, рекомбинантный ИНФ- $\alpha 16$ человека демонстрировал более высокую противовирусную активность по сравнению с Реафероном. Поэтому нельзя исключить, что химерный белок, состоящий из альбумина человека и ИНФ- $\alpha 16$ (**Альбурон 16**), наряду с улучшенными фармакологическими характеристиками, будет обладать более высокой противовирусной или антипролиферативной активностями, чем гибридный белок *HSA*-ИНФ- $\alpha 2b$ (**Альбуферон**). Учитывая данные о свойствах подобных химерных белков, можно сделать заключение, что полученный рекомбинантный белок **Альбурон 16** будет востребован в дальнейшем в качестве противовирусного или антипролиферативного лекарственного импортозамещающего препарата.

Summary

Karabelsky A. V., Padkina M. V. The recombinant human interferon alphas of the prolonged action.

Nowadays the recombinant interferon alphas are widely used in the treatment of viral and oncological diseases. The use of recombinant interferon alpha developed from bacteria cells has different side effects during the therapy period. In the current review the native and recombinant interferon alphas action is discussed and the ways of their pharmacological property improving by modifications and using the yeast expression systems are considered.

E-mail: karabel@bk.ru

Литература

1. *Ершов Ф. И.* Система интерферона в норме и при патологии. М., 1996.
2. *Карабельский А. В., Падкина М. В.* Создание штамма дрожжей *Pichia pastoris* продуцента гибридного белка «Альбурона 16» // Тез. Междунар. школы-конференции «Генетика микроорганизмов и биотехнология». Москва-Пушино, 28 ноября — 1 декабря 2006. С. 206–208.
3. *Карабельский А. В., Парфенова Л. В., Смирнов М. Н., Падкина М. В.* Создание штамма дрожжей *Pichia pastoris* продуцента гибридного

белка «Альбуферона16» // III Московский международный конгресс «Биотехнология — состояние и перспективы развития». М., 2005. С. 74–75. **4.** Никитин И. Г., Сторожиков Т. Н. Пегилированные лекарственные препараты: современное состояние проблемы и перспективы // Вирусные гепатиты: Достижения и перспективы. 2001. № 3 (13). **5.** Папкина М. В., Парфенова Л. В., Самбук Е. В. Штамм-дрожжей *Pichia pastoris* — продуцент лейкоцитарного интерферона-16 человека, рекомбинантная плазмидная ДНК рНН и способ ее конструирования // Патент РФ RU 2203950 С1.-МКИ С 12 N 15/21, 15/23, 1/19. 2002. **6.** Alvarado E., Ballou L., Hernandez L.M., Ballou C.E. Localization of alpha 1–3-linked mannoses in the N-linked oligosaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants // Biochemistry. 1990. Mar. 13. Vol. 29 (10). P. 2471–2482. **7.** Azaryan A. V., Wong M., Friedman T. C., Cawley N. X., Estivariz F. E., Chen H. C., Loh Y. P. Purification and characterization of a paired basic residue-specific yeast aspartic protease encoded by the YAP3 gene. Similarity to the mammalian pro-opiomelanocortin-converting enzyme. // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268 (16). P. 11968–11975. **8.** Baker D. E. Pegylated interferons // Rev. Gastroenterol. Disord. 2001. Vol. 1 (2). P. 87–99. **9.** Balan V., Nelson D. R., Sulkowski M. S., Everson G. T., Lambiase L. R., Wiesner R. H., Dickson R. C., Post A. B., Redfield R. R., Davis G. L., Neumann A. U., Osborn B. L., Freimuth W. W., Submanian G. M. A Phase I/II study evaluating escalating doses of recombinant human albumin-interferon-alpha fusion protein in chronic hepatitis C patients who have failed previous interferon-alpha-based therapy // Antivir. Ther. 2006. Vol. 11(1). P. 35–45. **10.** Brassard D. L., Grace M. J., Borden R. W. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein // J. Leukoc. Biol. 2002. Apr. Vol. 71 (4). P. 565–581. **11.** Brethauer R. K., Castellino F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins // Biotechnol. Appl. Biochem. 1999. Vol. 30 (Pt 3). P. 193–200. **12.** Brod S. A. Ingested type I interferon: a potential treatment for autoimmunity // J. Interferon Cytokine Res. 2002. Dec. Vol. 22 (12). P. 1153–1166. **13.** Chemmanur A. T., Wu G. Y. Drug evaluation: Albuferon-alpha — an antiviral interferon-alpha/albumin fusion protein // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2006. Aug. Vol. 7 (8). P. 750–758. **14.** Chin R., Locarnini S. New therapies for the treatment of chronic hepatitis B infection // Curr. Opin. Infect. Dis. 1998. Dec. Vol. 11(6). P. 719–726. **15.** Clare J. J., Romanos M. A., Rayment F. B., Rowedder J. E., Smith M. A., Payne M. M., Sreekrishna K., Henwood C. A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies // Gene. 1991a. Vol. 105. P. 205–212. **16.** Cregg J. M., Barringer K. J., Hessler A. Y., Madden K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations // Mol. Cell Biol. 1985. Dec. Vol. 5 (12). P. 3376–3385. **17.** Duman J. G., Miele R. G., Liang H., Grella D. K., Sim K. L., Castellino F. J., Brethauer R. K. O-Mannosylation of *Pichia pastoris* cellular and recombinant proteins // Biotechnol. Appl. Biochem. 1998. Vol. 28 (Pt. 1). P. 39–45. **18.** Escuret V., Martin A., Durantel D., Parent R., Hantz O., Trepo C., Menguy T., Bottius E., Dardy J., Maral J., Escary J. L., Zoulim F. Novel interferon alpha variant with improved inhibitory activity against HCV genotype 1 replication compared to IFN-alpha 2b therapy, in a subgenomic replication system // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. Vol. 50 (12). P. 3984–3991. **19.** Fleer R., Chen X. J., Amellal N., Yeh P., Fournier A., Guinet F., Gault N., Faucher D., Folliard F., Fukuhara H. High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 beta in *Kluyveromyces lactis* // Gene. 1991. Vol. 107(2). P. 285–295. **20.** Fleer R., Fournier A., Guittion J.-D., Gerard J., Yeh P. Fusion polypeptides comprising human serum albumin, nucleic acids encoding same, and recombinant expression thereof // United States Patent. 5,876,969. 1999. Mar. 2. **21.** Foser S., Renwanz I., Ebeling M., Heizmann C. W., Certa U. Interferon-alpha and transforming growth factor-beta co-induce growth inhibition of human tumor cells // Cell Mol. Life Sci. 2006. Oct. Vol. 63 (19–20). P. 2387–2396. **22.** Francis G. E., Fisher D., Delgado C., Malik F., Gardiner A., Neale D. PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques // Int. J. Hematol. 1998. Jul. Vol. 68 (1). P. 1–18. **23.** Garcia J. C. S., Ariza A. M., Lassa A. M., Gonzalez L. J., Perez V. B. Over-expression and single-step purification of human IFN α 8 and human IFN α 2b reveals the highest antiviral activity of human IFN α 8. // Microbial Cell Factories. 2006. Vol. 5 (Suppl I). P. 73. **24.** Glue P., Fang J. W., Rouzier-Paris B., Raffanel C., Sabo R., Gupta S. K., Salfi M., Jacobs S. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C intervention therapy group // Clin. Pharmacol. Ther. 2000. Vol. 68 (5). P. 556–567. **25.** Hadziyannis S. J. New developments in the treatment of chronic hepatitis B // Expert Opin. Biol. Ther. 2006. Sep. Vol. 6 (9). P. 913–921. **26.** Hung C. H., Lee C. M., Lu S. N., Wang J. H., Chen C. H., Hu T. H., Kee K. M., Chang K. C., Tseng P. L., Yen Y. H., Changchien C. S. Anemia associated with antiviral therapy in chronic

hepatitis C: incidence, risk factors, and impact on treatment response // *Liver Int.* 2006. Nov. Vol. 26 (9). P. 1079–1086. **27.** *Hussain M., Gill D.S., Liao M.J.* Both variant forms of interferon-alpha4 gene (IFNA4a and IFNA4b) are present in the human population // *J. Interferon Cytokine Res.* 1997. Vol. 17. P. 559–566. **28.** *Hussain M., Ni D., Gill D., Liao M.J.* IFN-alpha1a gene is the major variant in the North American population // *J. Interferon Cytokine Res.* 2000. Vol. 20 (9). P. 763–768. **29.** *Karpusas M., Nolte M., Benton C.B.* The crystal structure of human interferon- β at 2.2-Å resolution // *Prot. Natl. Sci. USA.* 1997. Vol. 94 (22). P. 11813–11818. **30.** *Knauff M.J., Bell D.P., Hirtzer P., Luo Z., Young J.D., Katre N.V.* Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263 (29). P. 15064–15070. **31.** *Loftis J.M., Wall J.M., Pagel R.L., Hauser P.* Administration of pegylated interferon-alpha-2a or -2b does not induce sickness behavior in Lewis rats // *Psychoneuroendocrinology.* 2006. Nov. Vol. 31 (10). P. 1289–1294. **32.** *Oh H., Okazaki N., Uno S., Miura M., Hiramatsu R.* Chromosomal DNA patterns and gene stability of *Pichia pastoris* // *Yeast.* 1998. vol. 14. P. 895–903. **33.** *Oishi H., Morimoto T., Watanabe Y., Tamai Y.* Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis*, and cloning of phospholipase B gene // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999. Vol. 63 (1). P. 83–90. **34.** *Osborn B.L., Olsen H.S., Nardelli B., Murray J.H., Zhou J.X., Garcia A., Moody G., Zaritskaya L.S., Sung C.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. Nov. Vol. 303 (2). P. 540–548. **35.** *Pawlotsky J.M., Gish R.G.* Future therapies for hepatitis C // *Antivir. Ther.* 2006. Vol. 11 (4). P. 397–408. **36.** *Pestka S.* The human interferon alpha species and receptors // *Biopolymers.* 2000. Vol. 55. P. 254–287. **37.** *Pestka S., Baron S.* Definition and classification of the interferons // *Meth. Enzymol.* 1981. Vol. 78. P. 3–14. **38.** *Pestka S., Langer J.A., Zoon K.C., Samuel S.E.* Interferons and their actions // *Ann. Rev. Biochem.* 1987. Vol. 56. P. 727–777. **39.** *Pedder S.C.* Pegylation of interferon alpha: structural and pharmacokinetic properties // *Semin. Liver Dis.* 2003. Vol. 23. Suppl. 1. P. 19–22. **40.** *Pfeffer L.M., Dinarello C.A., Herberman R.B., Williams B.R., Borden E.C., Bordens R., Walter M.R., Nagabhushan T.L., Trotta P.P., Pestka S.* Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons // *Cancer Res.* 1998. Jun. 15. Vol. 58 (12). P. 2489–2499. **41.** *Pomova N.I., Ivanikov I.O., Slutkin V.E.* Use of peg-intron in combined treatment of chronic liver disease caused by HIV infection // *Eksp. Klin. Gastroenterol.* 2003. Vol. (1). P. 42–45, 182. **42.** *Rinderknecht E., O'Conner B.H., Rodriguez H.* Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of site of glycosylation // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259 (11). P. 6790–6797. **43.** *Roberts M.J., Harris J.M.* Attachment of degradable poly(ethylene glycol) to proteins has the potential to increase therapeutic efficacy // *J. Pharm. Sci.* 1998. Vol. 87(11). P. 1440–1445. **44.** *Sato T., Suzuki E., Yokoyama M., Semba J., Watanabe S., Miyaoka H.* Chronic intraperitoneal injection of interferon-alpha reduces serotonin levels in various regions of rat brain, but does not change levels of serotonin transporter mRNA, nitrite or nitrate // *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2006. Aug. Vol. 60 (4). P. 499–506. **45.** *Siebeck N., Hurley D.J., Garcia M., Greene C.E., Kostlin R.G., Moore P.A., Dietrich U.M.* Effects of human recombinant alpha-2b interferon and feline recombinant omega interferon on in vitro replication of feline herpesvirus-1 // *Am. J. Vet. Res.* 2006. Sep. Vol. 67 (8). P. 1406–1411. **46.** *Sung C., Nardelli B., LaFleur D.W., Blatter E., Corcoran M., Olsen H.S., Birse C.E., Pickeral O.K., Zhang J., Shah D., Moody G., Gentz S., Beebe L., Moore P.A.* An IFN-beta-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates // *J. Interferon Cytokine Res.* 2003. Jan. Vol. 23(1). P. 25–36. **47.** *Syed S., Schuyler P.D., Kulczycky M., Sheffield W.P.* Potent antithrombin activity and delayed clearance from the circulation characterize recombinant hirudin genetically fused to albumin // *Blood.* 1997. May. 1. Vol. 89 (9). P. 3243–3252. **48.** *Yeh P., Landais D., Lemaire M., Maury I., Crenne J.Y., Becquart J., Murry-Brelier A., Boucher F., Montay G., Fleer R.* Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy: biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Mar. 1. Vol. 89 (5). P. 1904–1908. **49.** *Zeuzem S., Feinman S.V., Rasenack J., Heathcote E.J., Lai M.Y., Gane E., O'Grady J., Reichen J., Diago M., Lin A., Hoffman J., Brunda M.J.* Peginterferon alpha-2a in patients with chronic hepatitis C // *N. Engl. J. Med.* 2000. Vol. 343 (23). P. 1666–1672. **50.** *Zeuzem S., Welsch C., Herrmann E.* Pharmacokinetics of peginterferons // *Semin. Liver Dis.* 2003. Vol. 23. Suppl. 1. P. 23–28.