

تولید و خالص سازی اینترفرون لوکوسیت گاوی مقاوم اسید

دکتر محسن ابوالحسینی^۱، دکتر کرن جکبسن^۲

چکیده

پیش زمینه و هدف: لوکوسیت خون محیطی گاو در اثر ویروس‌ها اینترفرون ترشح می‌کنند. این اینترفرون می‌تواند در عفونت‌های ویروسی گاوی مورد استفاده بالینی قرار گیرد. به همین دلیل برای خالص سازی و بازیافت بیشتر اینترفرون گاوی به روشی مناسب نیاز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اینترفرون لوکوسیت خون محیطی گاو که در اثر تحریک با سندای ویروس تولید شده به کمک پتاسیم تیوسیانیید در pH ۳/۵ رسوب داده شد و با کروماتوگرافی ستونی سفادکس ۱۰۰-، همراه با اتیلن‌گلیکول خالص گردید. برای بازیافت و خلوص بیشتر اینترفرون از روش الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده شد.

یافته‌ها: استفاده از ۲۵٪ اتیلن‌گلیکول و یک مولار نمک طعام در بافر کروماتوگرافی ستونی باعث بازیافت بیش از ۹۳٪ فعالیت اینترفرون شد، در حالی که بدون افزایش اتیلن‌گلیکول فقط ۲۵٪ فعالیت اینترفرون حاصل شد. اینترفرون خالص شده توسط الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت و یک باند ۱۹ کیلو دالتونی که فعالیت اینترفرون داشت به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری: این روش برای تولید مقدار مناسب اینترفرون خالص طبیعی جهت تولید منوکلنال آنتی‌بادی در مطالعات بیولوژیکی مناسب می‌باشد.

کل واژگان: اینترفرون گاوی، اینترفرون مقاوم اسید، خالص کردن، ویروس سندای

مجله پزشکی ارومیه، سال چهاردهم، شماره چهارم، ص ۲۸۵-۲۷۶، زمستان ۱۳۸۲

آدرس مکاتبه: تهران - انستیتو پاستور ایران، گروه ایمنولوژی. E.Mail: Mabolhassani@yahoo.com

۱- دانشیار گروه ایمنولوژی انستیتو پاستور ایران

۲- استاد گروه ایمنولوژی دانشگاه جورجیا ایالات متحده آمریکا

مقدمه

دانشمندان نشان داده‌اند که وقتی لوکوسیت گاو در معرض ویروس یا ریبونوکلوئید مصنوعی تحریک کننده اینترفرون قرار گیرد مقدار زیادی اینترفرون تولید می‌کند (۴، ۱). اینترفرون تولید شده، گاو را علیه چالش با ویروس همولوگوس و هترولوگوس محافظت می‌کند. فعالیت ضد ویروسی اینترفرون گاو طبیعی و نوترکیب علیه ویروس‌های پاتوژنیک گاو در آزمایشگاه نشان داده شده است (۳، ۱۴، ۱۰). تاکنون مطالعات کلینیکی محدودی با اینترفرون گاو نوترکیب صورت گرفته است (۱۷، ۱۵)، ولی به دلیل نیاز به تولید زیاد اینترفرون طبیعی، کاربرد آن محدود بوده است (۱۹، ۱۸).

اینترفرون طبیعی لوکوسیت شامل مخلوطی از زیر گروه اینترفرون آلفا است، در حالی که اینترفرون نوترکیب شامل یک زیر گروه می‌باشد (۲۱، ۲۰). تفاوت فعالیت ضد ویروسی زیر گروه‌های اینترفرون تا ۲۰۰ برابر است (۲۲). پس از تزریق عضلانی، اینترفرون طبیعی در لوکوسیت‌ها بهتر از اینترفرون نوترکیب جذب می‌شود (۲۳) همچنین، پس از تزریق عضلانی میزان از بین رفتن زیر گروه‌های اینترفرون نوترکیب باهم تفاوت دارند (۲۴). مطالعات نشان داده است بیماری‌هایی که اینترفرون نوترکیب دریافت می‌کنند آنتی‌بادی ضد اینترفرون در آن‌ها ایجاد می‌شود (۲۵) ولی این آنتی‌بادی فعالیت اینترفرون طبیعی خالص شده را خنثی نمی‌کند. اینترفرون طبیعی لوکوسیت به تریسین حساس و در $\text{pH} = 2$ حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و حرارت‌های، ۲۰- و ۷۰- درجه سانتیگراد پایدار است (۲۶).

در این مقاله اینترفرون لوکوسیت گاو در اثر تحریک ویروسی تولید و برای مطالعات بیولوژیکی و تهیه منوکلنال آنتی‌بادی خالص می‌شود.

مواد و روش

تولید اینترفرون گاو:

اینترفرون گاو طبق روش جکبسون^۱ و همکاران تولید

شد (۲۶). به طور خلاصه، مقدار ۱۰-۲ لیتر خون از ورید گردن ۱۰-۶ گاو سالم گرفته شد و سلول‌های لایه سطحی^۲ جمع‌آوری و لوکوسیت‌ها با شستن آمونیوم کلراید ۰/۸۳ درصد جدا گردید. لوکوسیت‌ها در محیط ایگل^۳ حاوی ۰/۴ درصد یا ۲ درصد سرم جنینی گاو^۴ و یا بدون آن در فلاسک‌های اسپینر^۵ در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. لوکوسیت‌ها ($10^7 \times 1/2$ سلول در میلی‌لیتر) ابتدا بوسیله ۶۰ واحد هماگلوتینه کننده در میلی‌لیتر سندان ویروس تحریک و پس از دو ساعت با ۲۴۰ واحد هماگلوتینه کننده دیگر ویروس تحریک شدند. پس از ۲۰ ساعت، محلول صاف شده حاوی اینترفرون گاو جدا و ۲۰ دقیقه در $1000 \times G$ سانتریفوژ شد.

تست اینترفرون:

فعالیت ضد ویروسی اینترفرون به روش اثر سیتوپاتیک^۶ تعیین شد (۱۹). در این روش از سلول کلیه گاو^۷ و ویروس وزیکولار استوماتیتیس^۸ جهت چالش استفاده گردید. قبل از آزمایش محلول حاوی اینترفرون به مدت ۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد ($17500 \times G$) تا ویروس تحریک کننده خارج شود (۱۹).

غلظت کردن محلول ناخالص اینترفرون:

محلول صاف شده حاوی اینترفرون به کمک پتاسیم تیوسولفات، طبق روش برگ و هرون^۹ تغلیظ شد. به طور خلاصه پتاسیم تیوسولفات جامد به آهستگی به محلول سرد

1- Jacobsen

2- Buffy coat

3- Eagle

4- Fetal Bovine Serum (FBS)

5- Spinner

6- Microtiter Cytopathic Effect (CPE)

7- MDBK

8- Vesicular Stomatitis

9- Berg and Heron

در روش یک A، محلول ناخالص اینترفرون حاوی ۲٪ سرم گاوی و برای حل رسوب اینترفرون و شستشوی ستون از بافر فسفات استفاده شد. به دلیل این که تمام رسوب اینترفرون در این بافر حل نمی شود، رسوب حل نشده را در بافر حاوی یک مولار نمک و ۲۵٪ اتیلن گلیکول حل کرده و به ستون اضافه گردید و برای شستن ستون از این بافر استفاده شد (روش یک B). در روش دوم محلول ناخالص اینترفرون حاوی ۴٪ درصد سرم گاوی به کار رفت و در کلیه موارد از بافر فسفات استفاده شده در آزمایش سوم، محلول ناخالص اینترفرون بدون سرم گاوی به کار برده شد و در مراحل خالص کردن از بافر فسفات حاوی یک مولار نمک و ۲۵٪ اتیلن گلیکول استفاده شد.

نتایج

اثر سرم گاوی و اتیلن گلیکول در بازیافت اینترفرون خالص: با کاهش مقدار سرم گاوی در محیط کشت لوکوسیت ها، بازیافت اینترفرون از رسوب کاهش پیدا کرد (جدول ۱). ولی در نمونه بدون سرم گاوی، فعالیت اختصاصی اینترفرون خالص شده از ستون بیشتر از نمونه سرم دار (۲٪) بود در مقابل ($10^4 \times 6/4$ واحد در میلی گرم) ($10^4 \times 5/5$ واحد در میلی گرم). به دلیل اینکه جهت تهیه منوکلتال آنتی بادی به ناخالصی کمتری نیاز است از اینترفرون بدون سرم گاوی برای مراحل بعدی استفاده شد. با استفاده از ۲۵٪ اتیلن گلیکول و یک مولار نمک در بافر فسفات برای حل دوباره رسوب و شستن ستون، مقدار بازیافت کل اینترفرون ۱۰ برابر افزایش یافت (از ۳/۵٪ به ۳۴/۶٪). همچنین همان طور که جدول یک نشان می دهد، افزودن اتیلن گلیکول به بافر ستون نیز درصد بازیافت اینترفرون را افزایش می دهد (۷۲٪ در روش یک B، ۹۴٪ در روش سوم با مقایسه با روش دوم ۲۵٪).

اینترفرون اضافه گردید. تا غلظت نهایی ۰/۵ مولار به دست آید. سپس، به کمک اسید کلریدریک دو نرمال pH به ۳/۵ رسانده شد. پس از یک شب در حرارت ۴ درجه رسوب حاوی اینترفرون به کمک سانتریفوژ (۴۰ دقیقه در ۴ درجه با سرعت $2300 \times G$) جدا و در حداقل بافر فسفات نمکی $pH 7/2$ حل شد. رسوب غیر قابل حل با یک مولار نمک طعام و ۲۵٪ اتیلن گلیکول یک شب دیالیز شد و پس از تعیین فعالیت اینترفرون برای خالص سازی به کار رفت.

خالص سازی اینترفرون به وسیله ژل فیلتراسیون:

نود میلی گرم اینترفرون غلیظ شده در ۱۵ میلی لیتر بافر فسفات به داخل ستون ($2/5 \times 100$ cm) ریخته شد و فواکشن های ۲/۵ میلی لیتری جمع آوری و پس از غلیظ کردن با اولترافیلتراسیون و دیالیز کردن علیه بافر فسفات به کمک ۰/۲ میکرون استریل شد و برای آزمایش فعالیت اینترفرون به کار رفت. از بافر فسفات حاوی یک مولار نمک طعام و ۲۵٪ اتیلن گلیکول برای جدا سازی اینترفرون در ستون استفاده شد.

: SDS-PAGE

فواکشن هایی که فعالیت اینترفرون داشتند در ژل اکریل آمید ۱۰٪ طبق روش لاملی^۲ (۲۸) الکتروفورز شدند. برای مقایسه، اینترفرون نو ترکیب گاوی آلفا-۱ (سیباگایگی، آمریکا) و اینترفرون طبیعی کنار هم الکتروفورز شدند. برای نشان دادن فعالیت اینترفرون، ژل های رنگ نشده با قطعات ۲ میلیمتری تقسیم و پس از له کردن ژل و قراردادن در ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات و ۱۸ ساعت تکان دادن، محلول استریل و برای فعالیت اینترفرون به کار رفت.

اثر سرم گاوی و اتیلن گلیکول در بازیافت اینترفرون خالص شده:

برای خالص کردن اینترفرون از سه روش استفاده شد (جدول ۱).

1- Phosphate-Buffered-Saline (PBS)

2- Laemmli

تحت شرایط احیاء شده در ژل آکریل آمید ۱۰٪ الکتروفوروز شدند. شکل ۲ اینترفرون خالص شده بدون سرم گاوی خالص شده توسط ستون را نشان می‌دهد که فقط دارای یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۹ کیلو دالتونی می‌باشد. وزن مولکولی اینترفرون خالص شده با اینترفرون آلفا-۱ نو ترکیب گاوی و بتا- لاکتوگلوبولین B استاندارد مقایسه شد و پس از رنگ آمیزی با رنگ نقره باند اضافی مشاهده نگردید. برای اثبات اینکه باند پروتئینی ۱۹ کیلو دالتونی اینترفرون می‌باشد ژل مشابه رنگ نشده را به قطعات ۲ میلیمتری جدا کرده و پس از جداسازی پروتئین ۱۹ کیلو دالتونی فعالیت ضد ویروسی دارد و اینترفرون می‌باشد.

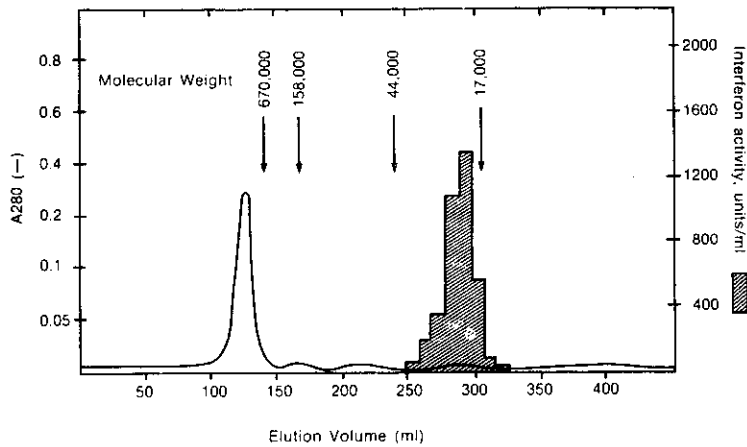
شناسایی فعالیت اینترفرون خالص در فراکشن‌ها :
شکل ۱ فراکشن‌های محلول اینترفرون بدون سرم جنینی گاوی را از ستون سفادکس ۱۰۰-G نشان می‌دهد. فراکشن‌هایی که فعالیت اینترفرون دارند وزن مولکولی آنها بین ۱۷ تا ۳۰ کیلو دالتون می‌باشد (فراکشن‌های ۲۵۰ تا ۳۱۰) حداکثر فعالیت اینترفرون در ناحیه حدود ۲۰ کیلو دالتون مشاهده گردید.

آنالیز اینترفرون خالص شده توسط SDS-PAGE :
فراکشن‌هایی که فعالیت اینترفرون بالایی داشتند توسط فیلتر شرکت آمیکون با محدوده مولکولی ده هزار دالتون غلیظ و

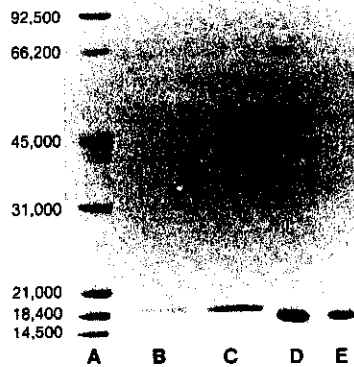
جدول شماره ۱: اثر غلظت سرم گاوی در محلول اینترفرون و اثر بافر مورد استفاده در بازیافت اینترفرون از ستون سفادکس .

روش مورد مطالعه				شرایط
۲	۲	۱B	۱A	
-	۰/۰۴	۲	۲	درصد سرم گاوی در محلول اینترفرون
۱۴۴۰	۱۲۱۸	۷۵۰	۷۵۰	واحد محلول اینترفرون (x ۱۰۰۰)
۷	۲۰	۳۶۰	انجام نشد	واحد اینترفرون حاصل از رسوب (x ۱۰۰۰)
۰/۵	۱۶/۸	۴۸	انجام نشد	اینترفرون حاصل از رسوب (درصد)
تیلن گلیکول - نمک	بافر فسفات نمکی	تیلن گلیکول - نمک	بافر فسفات نمکی	با فرمول مورد استفاده
بافر فسفات نمکی		بافر فسفات نمکی		
۶۷۴۷	۵۱۶۷۴	۲۵۹۳۵۰	۲۶۲۵۰	واحد اینترفرون حاصل از ستون
۹۴	۲۵	۷۲	انجام نشد	واحد اینترفرون حاصل از ستون (درصد)
۰/۵	۴/۲	۳۴/۶	۳/۵	کلی اینترفرون حاصل رسوب و ستون (درصد)
۶/۴x۱۰ ^۴	۴x۱۰ ^۴	۵/۵x۱۰ ^۴	انجام نشد	فعالیت اختصاصی اینترفرون (U/mg) حاصل از ستون

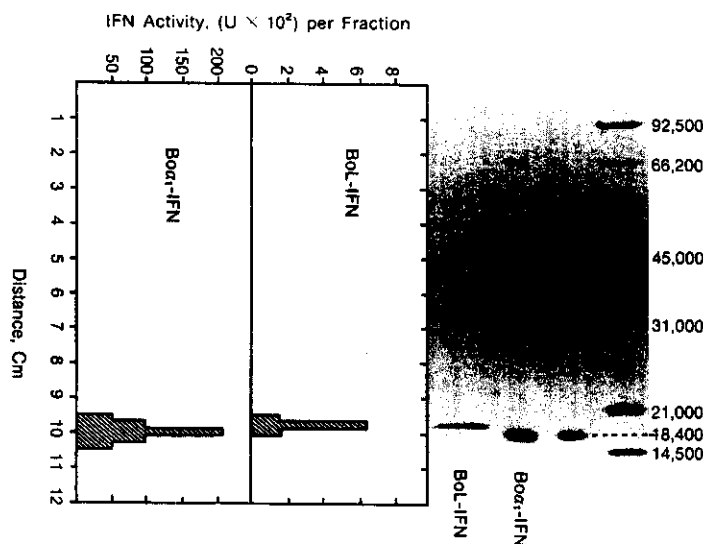
تولید و خالص سازی اینترفرون گاوی لوکوسیت مقاوم اسید



شکل شماره ۱: خالص سازی اینترفرون گاوی توسط ستون سفادکس ۱۰۰ - G. اینترفرون غلیظ شده به ستون ریخته شد و فراکشن‌ها پس از شستشوی ستون توسط بافر فسفات حاوی یک مولار نمک و ۲۵٪ اتیلن گلیکول جمع آوری و جهت فعالیت اینترفرون مورد آزمایش قرار گرفتند.



شکل شماره ۲: SDS-PAGE اینترفرون خالص شده توسط ستون. پنج میکروگرم نمونه (شامل ۹۰۰ واحد اینترفرون) در شرایط احیاء الکتروفورز و سپس با کوماسی بلوررنگ آمیزی شد. رنگ آمیزی با رنگ نقره باند پروتئینی جدیدی را نشان ندارد. A، وزن مولکولی استاندارد، B و C، اینترفرون گاوی، D، اینترفرون گاوی نو ترکیب و E، بتالاکتوگلوبولین B استاندارد با وزن مولکولی ۱۸/۴۰۰ دالتون.



شکل شماره ۳: مقایسه آنالیز SDS-PAGE و فعالیت اینترفرون گاوی طبیعی با اینترفرون گاوی نوترکیب در ژل آکریل آمید. آزمایش نشان می‌دهد که باند پروتئین خالص شده از ستون کروماتوگرافی اینترفرون می‌باشد. ژل با کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و با رنگ نقره باند جدیدی مشاهده نگردید.

بحث

حذف سرم گاوی روی تیترا اینترفرون اثری ندارد ولی، به حذف پروتئین‌های ناخواسته در تهیه اینترفرون کمک می‌کند. با این وجود، حذف سرم گاوی بازیافت اینترفرون را از رسوب کاهش می‌دهد. بازیافت اینترفرون از رسوب، بدون وجود سرم گاوی، ۵/۰ درصد بود. در حالی‌که با حضور ۲٪ سرم گاوی به ۴۸ درصد رسید. به دلیل این که اینترفرون به سایر پروتئین‌ها مانند آلبومین متصل می‌شود مقدار یک مولار نمک و اتیلن گلیکول برای جداسازی اینترفرون از پروتئین‌های ناخواسته مؤثر می‌باشد.

اینترفرون به دست آمده مانند اینترفرون لوکوسیت انسانی (۲۷)، در $\text{pH} = 2$ پایدار است (۲۶) و پس از حرارت 100°C درجه همراه با سدیم دو دسیل سولفات و مرکاپتواتانل فعالیت بیولوژیک خود را از دست نمی‌دهد.

چندین گونه اینترفرون طبیعی لوکوسیت انسان شناسایی و روش‌های معمول (۲۸، ۲۹)، الکتروفورز در پلی‌اکریلامید و سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) (۲۷) کروماتوگرافی جذبی، متوکلائال و پلی کلئال آنتی بادی (۳۰، ۳۱) یا با دستگاه کروماتوگرافی فشار زیاد (HPLC) (۳۲) خالص گردیدند. در این مقاله، اینترفرون گاوی حاصل از خون محیطی که توسط ویروس سندانای تحریک شده است با ستون کروماتوگرافی الکتروفورز خالص شده و یک باند پروتئینی ۱۹ کیلو دالتونی با فعالیت ضد ویروسی به دست آمد. فاکتورهایی که در مراحل خالص سازی اینترفرون اثر می‌گذارند شامل حذف سرم گاوی از محیط کشت و افزودن نمک طعام یک مولار و ۲۵٪ اتیلن گلیکول به بافر (برای حل رسوب و شستن ستون) می‌باشند.

میلی لیتر متوقف می کند. فعالیت اینترفرون همراه با ۱۳۸ میکرومول N-بوتیل داکسی فوجیریمایسین حدود ۵۸ بار افزایش پیدا می کند (۳۳). اینترفرون گاوی نیز ممکن است همراه با این یا سایر مواد اثر سینرژیک داشته باشد و در معالجه بیماری های ویروسی گاوی مؤثر باشد.

اخیراً نشان داده شده است که اینترفرون آلفا-۲b به تنهایی یا همراه با ریناویرین برای معالجه عفونت ویروس هپاتیت C مزمن در آمریکا مورد تأیید قرار گرفته است. هم چنین، این اینترفرون پس از افزودن در عرض یک ساعت پس از عفونت تولید ۵۰٪ ویروس اسهال گاوی را با ۳ واحد بین المللی در

References

- 1- Rosenquist BD, Loan RW: Production of circulating interferon in the bovine species. *Am J Vet Res*, 1969, 30: 1293-1303.
- 2- Theil KW, Mohanty SB, Hetrick FM: Effects of poly I: C on infectious bovine rhinotracheitis virus infection in calves. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1971, 137: 1176-1179.
- 3- La Bonnardiere C, De Vaureix C, L'Haeidon R, Scherrer R: Weak susceptibility of rotavirus to bovine interferon in calf kidney cells. *Arch Virol*, 1980, 2: 167-170.
- 4- Vanden Broecke C, Schweres A, Dagenais L, Goossens A, Maenhoudt M, Pastoret PP, Werenne J: Interferon response in colostrum - deprived newborn calves infected with bovine rotavirus: Its possible role in the control of the pathogenicity. *Ann Rech Vet*, 1984, 15 (1): 29-34.
- 5- Todd JD, Volenec FJ, Paton IM: Interferon in nasal secretions and sera of calves after intranasal administration of a virulent infectious bovine rhinotracheitis virus: Association of interferon in nasal secretions with early resistance to challenge with virulent virus. *Infect Immunol*, 1972, 5: 699-706.
- 6- Straub C, Ahl R: Local interferon production in cattle after intranasal infection with a virulent IBR/IPV virus and its effects on a subsequent infection with foot and mouth disease virus. *Zentralbl Veterinaarmed Reihe B*, 1976, 5-6: 470-482.
- 7- Cummins JM, Rosenquist BD: Protection of calves against rhinovirus infection by nasal secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res*, 1980, 41: 161-165.
- 8- Cummins JM, Rosenquist BD: Partial protection of calves against parainfluenza3 virus infection by nasal-secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res*, 1982, 43: 1334-1338.

- 9- Cummins JM, Rosenquist BD: Temporary protection of calves against adenovirus infection by nasal secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res*, 1982, 43: 955-959.
- 10- Polatnick J, Richmond JY: Viral interference phenomena induced by foot and mouth disease temperature sensitive mutants in bovine kidney cells. *Arch Virol*, 1962, 61: 105-114.
- 11- Fulton RW, Downing M.M, Cummins JM: Antiviral effects of bovine interferons on bovine respiratory tract viruses. *J Clin Microbiol*, 1984, 19: 492-497.
- 12- Fulton RW, Burge LJ, McCracken JS, Effect of recombinant DNA-derived bovine and human interferons on replication of bovine herpesvir-us-1, parainfluenza-3, and respiratory syncytial viruses. *Am J Vet Res*, 1986, 47: 751-753.
- 13- Gillespie JH, Robson DS, Scott FW, Schiff EI: In vitro protective effect of bacteria -derived bovine alpha interferon I I against selected bovine viruses. *J Clin Microbiol*, 1985, 22: 912-914.
- 14- Hofmann VW, Danner K, Seeger K: Erste Erfahrungen bei der Behandlung von virus-bedingten Kalberdurchfallen mit gentechnisch erzeugtem interferon. *Dtsch Tieraerztl Wochenschr*, 1985, 92: 278-280.
- 15- Babiuk LA, Bielefeldt Ohmann H, Gifford G, Czarniecki CW, Scialli VT, Hamilton EB: Effect of bovine alpha1 interferon on bovine herpesvirus type 1-induced respiratory disease. *J Gen Virol*, 1985, 66: 2383-2394.
- 16- Babiuk LA, Lawman MJP, Gifford GA: Use of recombinant bovine alpha1 interferon in reducing respiratory disease induced by bovine herpes virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31 (5): 752-757.
- 17- Gillespie J, Scott F, Geissinger C, Schiff E: The prophylactic effects of E. coherived bovine interferon alpha-I on bovine virus diarrhoea virus disease in calves after intramuscular administration. *J Vet Med B*, 1986, 33: 771-776.
- 18- Jacobsen KL, Rockwood GA, Abolhassani M, Evans DL: Chitwood, S.W. and Charamella, L., 1988. Kinetics of the large-scale production of bovine leukocyte interferon with 3 different virus inducers. *Am J Vet Res*, 1989, 49 (9): 1441-1446.
- 19- Jacobsen KL, Abolhassani M, Chitwood S: Effect of Sendai inducing virus in cytopathic effect inhibition assay of bovine leukocyte interferon. *Vet Immunol Immunopathol*, 1988, 18: 237-244.
- 20- Stewart WE, Desmyter J: Molecular hetero-

- genity of human leukocyte interferon: Two populations differing in molecular weights, requirements for renaturation and cross-species antiviral activity. *Virology*, 1975, 67: 68-78.
- 21- Bodo G, Adolf GR: Separation and characterization of human IFN-alpha subtypes. In: E. DeMaeyer and H. Schellekens (Editors), *The Biology of the Interferon System*. 1st ed, Amsterdam, Elsevier, 1983: 113-118.
- 22- La Bonnardiere C, Cohen J, Contrepolis M: Interferon activity in rotavirus-infected newborn calves. *Ann Rech Vet*, 1981, 12 (1): 85-91.
- 23- Gutterman JU, Fine S, Quesada J, Horning S, Levine J, Alexanian R, Bernhardt L, Kramer M, Spiegel H, Colburn W, Trown P, Merigan T, Dziewanowski Z: Recombinant leukocyte A interferon: pharmacokinetics, single-dose tolerance, and biologic effects in cancer patients. *Ann Intern Med*, 1982, 96: 549-556.
- 24- Borden EC, Hawkins MJ, Merritt JA, Ball LA, Grossbard E, Kramer M: Comparison of the biological effects in man of two recombinant interferons alpha (rA and rD). Abstract 3rd Ann Internal Congress Interferon Res Miami, 1982.
- 25- Steiss RG, Smith JW, Urba WJ, Clark JW, Itri LM, Evans LM, Schoenberger C, Longo DL, Resistance to recombinant interferon alpha-2 in hairy-cell leukemia associated with neutralizing anti-interferon antibodies. *New Engl J Med*, 1988, 318 (22): 1409-1413.
- 26- Jacobsen KL, Rockwood GA, Abolhassani M, Evans DL, Chitwood SW, Charamella L: Bovine leukocyte interferon: Characterization and large-scale production. *J Interferon Res*, 1988, 8 (2): 133-138.
- 27- Berg K, Heron L: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified human leukocyte interferon and the antiviral and anticellular activities of the different interferon species. *J Gen Virol*, 1980, 50: 441-446.
- 28- Berg K, Heron L: The complete purification of human leukocyte interferon. *Scand J Immunol*, 1980, 11: 489-502.
- 29- Zoon KC, Miller D, Nedden DZ, Hunkapiller MW: Human leukocyte-derived alpha- interferons: Purification and amino-terminal-amino-acid sequence of two components. *J Interferon Res*, 1982, 2: 253-259.
- 30- Berg K, Heron L, Hamilton R: Purification of human interferons by antibody affinity chromatography using highly absorbed anti-interferon. *Scand J Immunol*, 1978, 8: 429-436.
- 31- Secher DS, Burke DC: A monoclonal

- antibody for large-scale purification of human leukocyte interferon. *Nature*, 1980, 285: 446-450.
- 32-** Rubinstein M, Levy WP, Moschera JA, Lai C, Herschberg RD, Bartlett RT, Pestka S: Human leukocyte interferon: Isolation and characterization of several forms. *Arch Biochem Biophys*, 1981, 210: 307-318.
- 33-** Ouzounov S, Mehta A, Dwek RA, Block TM, Jordan R: The combination of interferon alpha-2b and n-butyl deoxyojirimycin has a greater than additive antiviral effect upon production of infectious bovine viral diarrhea virus (BVDV) in vitro: implications for hepatitis C virus (HCV) therapy. *Antiviral Res*, 2002, 55 (3):425-435.