

Biyoteknolojik İlaçlar, Genel Bakış

Biotechnological Drugs, General Perspective: Review

Sibel İLBASMIŞ TAMER,^a
İsmail Tuncer DEĞİM^a

^aFarmasötik Teknoloji AD,
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 01.07.2015
Kabul Tarihi/Accepted: 08.01.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:
Sibel İLBASMIŞ TAMER
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji AD, Ankara,
TÜRKİYE/TURKEY
ilbasam@yahoo.com

ÖZET Canlı organizmaların tamamı ya da bir parçası kullanılarak yeni bir ürün elde etmek veya var olan bir ürünün genetik yapısında istenilen yönde değişiklikler meydana getirmek amacıyla ile kullanılan yöntemlerin tamamı biyoteknoloji konusunu içermektedir. Biyoteknolojik ürün dediğimizde canlı organizmadan elde edilen ürün anlaşılmaktadır. Biyolojik sistemlerin ve yaşayan organizmaların teknolojiye kullanılması ve bunlardan yarar sağlanması biyoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Sağlık alanında, kimya endüstrisinde, gıda ve tarım alanında, elektronik, madencilik, kâğıt endüstrisinde, enerji alanında ve çevre sağlığının korunması gibi pek çok alanda biyoteknoloji kullanılmaktadır. Örneğin; yıllardır fermantasyon ile üretilen peynir, şarap, alkol, fumarik asit, klasik biyoteknolojinin başlangıcını oluşturmaktadır. Sağlık alanında ise DNA'nın yapısının anlaşılması ile rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi, monoklonal antikor teknolojisi, hibridoma teknolojisi ve gen tedavisi gelişmiş; yeni ilaçlar ve güvenilir aşular üretilmeye başlanmıştır. Kanser, AIDS, viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların ortaya çıkmasıyla da biyoteknoloji gelişmiştir. Formülasyon ve çalışmalar hastalığa yönelik olmaya başlamıştır. Biyoteknolojide kullanılan ürünler yüksek spesifik aktiviteli, yan etkileri az maddelerdir. Biyoteknolojik ürünlerin giderek artan önemi bu ürünlerin analiz edilmesini de önemli kılmaktadır. Biyoteknolojik ürünler elektroforez, spektrofotometrik, kromatografik, kolorimetrik ve immünojenik yöntemler gibi pek çok değişik yöntem ile analiz edilebilir. Bu teknikler klinik araştırmalarda giderek önem kazanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji; antikorlar, monoklonal

ABSTRACT The concept of biotechnology involves a part of living organisms to produce a new product or all methods used to change in the desired direction via the genetic structure of an existing product. Biotechnological product means a product obtained from living organisms. To use biological systems or living organisms and to get benefit from them are the basis of the biotechnology. Biotechnology is used in many areas for example in the field of health, chemical industry, in the food area, in agriculture, electronic, mining, in the paper industry, in the energy field and in many areas, such as the protection of environmental health. For instance, cheese, wine, alcohol, fumaric acids have been producing by fermentation for years and biotechnology was started with this conventional biotechnology. In medical area, recombinant DNA (rDNA), monoclonal antibody technology, hibridoma technology and gene therapy have been developed by means of understanding of DNA structure in detail. New drugs and vaccines have been started to produce. Biotechnology has been developing by the occurrence of cancer, AIDS, viral infections. All formulation development attempts and related investigations are target to specific disease. Biotechnological products are highly specific in activity and represent less side effects. The growing importance of biotechnology products makes it important to analyze these products. The biotechnological products can be analyzed with numerous methods such as electrophoresis, spectrophotometric, chromatographic, immunological, colorimetry. These techniques are becoming increasingly important in clinical trials.

Key Words: Biotechnology; antibodies, monoclonal

doi: 10.5336/pharmsci.2015-46958

Copyright © 2016 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Pharm Sci 2016;5(2):77-92

Modern biyoteknoloji, biyoteknolojik sistemlerin ve yaşayan mikroorganizmaların teknolojiye kullanılması ve bunlardan yarar sağlanması ile ilgilidir. Başka bir deyişle biyoteknoloji yeni işlem ve ürünlerin yaratılması için canlı sistemlerin kullanılmasıdır. Biyoteknoloji pek çok farklı disiplinden bilim dalını, (kimya, biyokimya, gen mühendisliği, eczacılık, moleküler biyoloji, matematik, bilgisayar mühendisliği, matematik mühendisliği) bir arada içermektedir.^{1,2} Biyoteknolojinin uygulama alanları oldukça geniştir. İlaç endüstrisi (yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi, rekombinant teknikler kullanılarak protein ve antikor üretimi, aşuların geliştirilmesi, hormon üretimi, hızlı tanı yöntemleri için çeşitli kitlerin üretimi), kimya endüstrisi (biyo polimerlerin eldesi), gıda endüstrisi (enzimler, koku ve tat verici maddeler, baharat, boya, genetiği değiştirilmiş ürünlerin tespiti, et ve et ürünlerinin orijininin tespiti), tekstil endüstrisi (ipek, selüloz eldesi), tarım ve ziraat (yeni bitki türlerinin eldesi, mevcut bitki türlerinin iyileştirilmesi, biyo pestisitlerin eldesi, hastalığa karşı dayanıklı bitki türlerinin üretimi, zorlu iklim koşullarında bitkilerin yetiştirilmesi), elektronik endüstrisi (biyo çiplerin eldesi), kâğıt endüstrisi (kâğıt hamurunun hazırlanması sırasında linin maddesini parçalayan enzimlerin eldesi), çevre temizliği (toksik atıkların temizlenmesi, biyolojik olarak parçalanabilir deterjan üretimi), enerji (enerji üreten yağların eldesi), madencilik (metal ve minerallerin temizlenmesinde mikro organizmalardan yararlanılır) ve kriminal çalışmalarda DNA analizleri, gibi pek çok sahada kullanımları bulunmaktadır.¹⁻³

BİYOTEKNOLOJİNİN UYGULAMA ALANLARI

1. Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde,
2. Yeni aşuların geliştirilmesi, formülasyonları ve uygun verilmiş yollarının geliştirilmesinde (rDNA),
3. Monoklonal antikor teknolojisi ile mevcut ve gelecekteki ilaçların geliştirilmesinde,
4. Piyasadaki mevcut ürünlerden daha üstün özelliğe sahip, ekonomik, etkili, güvenilir kalitede ilaçların hazırlanmasında,
5. Enzim ve hormon yapısındaki maddelerin, endojen kaynaklı maddelerin tanınması ve karakterlerinin belirlenmesinde,

6. Farmasötik üretimin artırılmasında,
7. Biyoteknolojik ürünlerin (peptit, proteinlerin) formülasyonlarının geliştirilmesi; etkili, güvenilir kalitede formülasyonların yapılmasında,
8. Biyoteknolojik ürünler teşhis (diagnostik) amaçlı da kullanılmaktadır.^{3,4}

BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERİN ÖNEMLİ ÖZELLİKLERİ

Avantajları;

1. Yüksek spesifik aktivite gösterirler.
2. Diğer sentetik ilaçlara göre yan etkileri azdır. Daha iyi tolere edilirler,
3. Çok az dozlarda bile etkilerini gösterirler.³

Dezavantajları;

1. Oral uygulamalar için çok uygun değildir,
2. Gastrointestinal kanalda enzimatik olarak parçalanırlar,
3. Membranlardan geçişleri zordur. Permeabiliteleri düşüktür,
4. Çok büyük molekül ağırlığına sahiptirler

Bu nedenlerden dolayı formülasyonları zordur. En çok parenteral yolla verilmektedirler. Transmukozal yollardan, nazal, bukkal, vajinal, rektal, pulmoner, transdermal yollardan da verilebilirler.⁴⁻⁶

BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERİN KALİTE KONTROLLERİ

Elde edilen biyoteknolojik ürünün saflığı çok önemlidir. Saflaştırmak için çöktürme, jel elektroferez, ultrasantrifüj ve ultrafiltrasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır.^{7,8} Saflaştırma işlemi; başlangıç saflaştırma, ara saflaştırma ve sonuç saflaştırma olarak üç aşamada yapılmaktadır. Örneğin; İmmün globulin (Ig)'lerin saflaştırılması için düşük konsantrasyonlarda amonyum sülfat kullanılarak çöktürme işlemi yapılmaktadır. Ya da polietilen glikol 6000 (PEG 6000) kullanılarak IgG ve, IgM saflaştırılmaktadır. Monoklonal antikorların saflaştırılması için kaprilik asit kullanılmaktadır. Ara

saflaştırmada büyük ölçekte saflaştırma işlemi yapılmaktadır. Bu amaçla adsorpsiyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi en çok kullanılan yöntemlerdendir. Sonuç saflaştırmada elde edilen ürün tüm kirlilik ve kontaminantlardan arındırılır, bakteri, mantar ve virüs uzaklaştırılır. Sonuç saflaştırma için jel elektroforez yöntemi kullanılabilir. Bu amaçla granüle edilmiş dekstran, akrilamit ve agaroz gibi jeller kullanılır.⁹

Parenteral yolla kullanılan biyoteknolojik ürünlerin steril olarak hazırlanmaları gerekmektedir. Bunun için aseptik koşullarda hazırlanır ve 0,22 µm'lik membran filtreden süzülür. Biyoteknolojik ürünlerin sterilizasyonunda otoklav ve gaz sterilizasyonu yapılmaz. Protein yapısındaki maddeler sıcaklıkla bozunur, denatüre olur. Radyasyon ile sterilizasyon yapılması genelde istenmez, çünkü serbest radikal oluşumu ve yüksek enerji nedeni ile proteinlerin yapısında denatürasyon ve sonuçta agregasyon olabilir.⁷⁻⁹

KLİNİKTE EN ÇOK KULLANILAN BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLER VE ÖZELLİKLERİ

SİTOKİNLER

Bağışık yanıtın düzenlenmesi ile ilgili hücrelerce salınan hormon benzeri aracı maddelere genel olarak sitokinler denilmektedir. Sitolinlerin iki majör sınıfı vardır:

Lenfokinler; Lenfokinler lenfositlerden üretilir.

Monokinler; Monokinler monositlerden üretilir. Sitolinler, hedeflendirilmeleri ve kaynakları bakımından hormonlardan biraz farklıdır. İnsülin ve büyüme faktörleri sistemik olarak etki eden sitokin örnekleridir.^{10,11} Somatotropin, interlökin (IL) ve büyüme faktörleri organizma tarafından üretilen belirli hormonal faktörlere sahiptirler.

İnterferon

İnterferon (IFN) virüslere ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna karşı etkilidir. Gıda ve İlaç Dövesi

[Food and Drug Administration (FDA)], AIDS'e bağlı kaposi sarkoması, saçlı hücre lösemisi, hepatit B ve genital sinirler gibi değişik hastalıkların tedavisinde kullanılan rekombinant IFN kullanımını onaylamıştır.

İnterlökinler

IL, lökositler arasında mesaj iletici fonksiyona sahiptir.¹²

İnterlökin 1: Monokindir ve aktive edilmiş makrofajlardan üretilmektedir. Enfeksiyon ajanlarına immün yanıtı başlatmaktan sorumludur.

İnterlökin-2: Major T- hücresi büyüme faktörü olarak da bilinen bir lenfokindir. T hücrelerinin yüzeyindeki spesifik bir reseptöre bağlanmasıyla etki eder. FDA, böbrek hücreleri karsinomunda kullanılmak üzere rekombinant IL-2 preparatını Aldesleukin [Proleukin® (Novartis pharmaceuticals, UK)] onaylamıştır.¹²⁻¹⁴

Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör

Kemik iliğini stimüle ederek nötrofil üretimini sağlar. FDA tarafından onaylanan γCSF preparatı Filgrastim [Neupogen® (Amgen Company, USA)] kemoterapi gören hastalarda kemik iliği transplantasyonunda ve nötropenili hastalarda kullanılır.^{12,13}

Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör:

Kemik iliğinde nötrofil ve makrofaj üretimini stimüle eder. FDA rekombinant granülosit makrofaj koloni ayırıcı faktör [granulocyte- macrophage colony- stimulating factor (GM- CSF)] Sargramostim [Leukine® (Bayer Company, USA)] onaylamıştır. Bu ilaç yoğun kemoterapi ve radyoterapi sırasında kemik iliği tahrip olmuş hastalarda ve transplantasyonda kullanılır. Rekombinant insan insülini benzeri büyüme faktörü (yh-IGF-1) klinik deneme safhasındadır.^{12,13, 15}

İMMÜNGLOBULİN

Ig'ler protein yapısındadır. Çok sayıda çeşitli organik bileşiklere bağlanabilirler. Ig'ler, bağışık yanıt sonucunda kendilerinin oluşmasında etkin olan antijenlerle özgün olarak birleşerek reaksiyonlara neden olurlar. İlgü duydukları antijene göre afini-

teleri değişir ve spesifik yere göre bağlanırlar. IgE, hipersensitivite allerjik reaksiyonlarda görev yaparlar. Allerjik reaksiyonlarda IgC, denilen test yapılır. IgM, kandan enfeksiyon partiküllerinin klerensini artırır. IgG antijenlere karşı yüksek afinite gösterir. IgD, B lenfositleri plazma membranlarında bulunur. Antijen içeren bir reseptöre etki edebilir.

BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Epidermal büyüme faktörü: İmmun sistem üzerinde etkilidir. Her dokuda spesifik büyüme faktörü vardır. Yara iyileşmesinde çok kullanılır.¹⁶ 1963 yılında izole edilmiştir.

Fibroblast büyüme faktörü: Embriyojenik mezoderm formunda bulunan hücreler için mitojenik etkiye sahiptir. Tek polipeptit zincirinden meydana gelmiştir.

Sinir Büyüme Faktörü: Sinir hücresinin farklılaşmasını ve büyümesini stimüle eder. Mitojenik etkisi embriyojenik yaşamın ilk kısmında sınırlıdır.

Tümör nekrozis faktör- α ve Tümör nekrozis faktör β : Non malignan hücrelerin transformasyonu sonucu ortaya çıkmıştır.

PDGF (Platelet Derived Growth Factor): Trombositlerin α granüllerinde saklanır. Vasküler yaralanmalardaki yara iyileşmesini stimüle eder. Rekombinant insan platelet türevi büyüme faktörü (γ PDGF) klinik deneme safhasındadır.¹¹

ENZİMLER

Rekombinant enzimler değişik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Alteplaz: Akut miyokard infarktüsü ve pulmoner embolide plazminojenin proteolitik enzimle plazmine dönüşümünü hızlandırmaktadır. Rekombinant doku tipi plazminojen aktivatörüdür.¹²⁻¹⁸

Dornase α : Kistik fibrozda fazla mukus sekresyonunu azaltarak sekresyonu daha az yapışkan hale getirir. Dornase [Pulmozyme® (Genentech Inc, USA)] aerosol şeklinde intraselüler DNA'ya etki eder.¹²⁻¹⁷

HORMONLAR

Hormonlar özel bezler tarafından salgılanan kan yoluyla ulaştıkları organ ve dokularda fonk-

siyon düzenleyici etki gösteren ve çok düşük miktarları ile görev yapan organik bileşiklerdir.¹² **Rekombinant insan insülini:** Rekombinant insülin üretilen ilk ticari rekombinant preparattır. Rekombinant insan insülini çabuk ve etkili yanıt oluşturmaktadır ve immün sistemle ilgili yan etkileri daha azdır.

Lispro: Lispro [Humalog® (Elly Lilly, USA)] rekombinant insüline benzer ve daha çabuk etki eder.¹²

Epoetin α : Böbrekte üretilen bir hormon olan eritropoetin (EPO) kemik iliğini stimüle ederek kırmızı kan hücrelerinin üretimini sağlar. FDA kronik böbrek yetmezliğinde kullanılmak üzere EPO'yu onaylamıştır.¹²⁻¹⁸

Rekombinant insan büyüme hormonu: Vücutta hGH eksikliğinden kaynaklanan büyüme bozukluklarının tedavisinde kullanılır.^{12,17}

PIHTILAŞMA İLE İLGİLİ FAKTÖRLER

Rekombinant antihemofilik faktör (γ AHF): Hemofili A'da kullanılmaktadır. Kanın yavaş pıhtılaşması ve bu nedenle gerçekleşen kan kayıplarını engellemektedir.^{12,17}

Rekombinant koagülasyon faktör IX [Benefix® (Wyeth pharmaceuticals, USA)]: Hemofili B'de görülen faktör IX eksikliği tedavisinde kullanılır. FDA tarafından onaylanmıştır.¹⁷

GEN TEDAVİSİNDE KULLANILAN ÜRÜNLER

Gen tedavisi, genetik bir hatanın düzeltilmesi veya hücreye yeni bir işlev kazandırmak amacıyla bir genin insan hücresine nakledilmesi veya hatalı genin çıkarılması işlemidir. İyileştirme, düzeltme, tedavi ve onarma amaçları ile yapılmaktadır. Kalıtsal hastalıklar, kanser, enfeksiyon hastalıkları, hemofili, immün yetmezlik, Gaucher hastalığı, kistik fibroz, romatoid artrit gibi hastalıklarda gen tedavisi kullanılması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.^{17,19} Lenfoma hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere 1987 yılında rituksimab antikoru FDA tarafından onaylanmıştır, böylece immüno terapi kanser hastalarının tedavisinde kullanılmaya başlamıştır. Ex vivo olarak ilk klinik uygulama

1990 yılında yapılmıştır. Adenozin deaminaz enzimindeki kalıtsal etkiler nedeni ile oluşan immun yetmezlik tedavisinde kullanılmıştır. Hastaların kan lenfositleri ve kemik iliği hücrelere ayrılarak retroviral vektörlerle bu hücrelerin kromozomlarına sağlıklı adenozin deaminaz enzimi geni yerleştirilmiş ve hücreler hastalara transfüzyon ve transplantasyonla nakledilmiştir.²⁰ Bir başka klinik uygulama ise düşük yoğunluklu lipoprotein [low density lipoprotein (LDL)] reseptörü eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan hiperkolesterolemi hastalığında kullanılmıştır. Yeni bir teknik olmasına rağmen dokuz adet oligonükleotid preparatı FDA tarafından klinik araştırma için onay almıştır.²⁰ Pek çok çalışma faz 2 ve faz 3 aşamasındadır; prostat kanseri, pankreas kanseri, beyin, deri, kolon, göğüs ve böbrek kanserlerinin tedavisinde kullanılmak üzere klinik denemeleri yapılmaktadır.²¹

Katyonik lipitler: DNA'nın negatif yüklü gruplarından özellikle fosfat grupları ile etkileşerek yükü nötralize eden ve DNA'nın daha sıkı bir yapı haline gelmesini sağlayan amfililik moleküllerdir. Bu amaçla "lipofection" (lipid-based transfection technology) adıyla yeni bir teknik ileri sürülmüş ve DNA transfeksiyonu için çeşitli katyonik lipozomlar ve lipitler kullanılmaya başlanmıştır. En çok kullanılan ticari lipit formülasyonları Dope®, Dotma®, Dotap® Dmrie® gibi gen taşıma vektörü olarak kullanılan lipitlerdir.²²

AŞILAR

Aşılar enfeksiyonlara karşı koruyucu ve tedavi edici amaçlarla kullanılmaktadır. Biyoteknolojik aşılar, rekombinant DNA aşıları, sentetik peptit aşıları, antiidiyotip antikor aşıları ve mutant aşılar olarak sınıflandırılırlar.³

Rekombinant DNA aşıları: Enfeksiyon etkeninin, enfeksiyona neden olan antijenlerin immünojenik karakterdeki kısımlarının sentezini kodlayan genlerin klonlanması sonucu elde edilen gen ürününün aşı olarak kullanılmasıdır. Rekombinant viral, rekombinant bakteriyel ve rekombinant paraziter aşılar bulunmaktadır. Rekombinant hepatit B aşısı, şap aşısı ve enfeksiyöz bronşit virüs aşıları rekombinant virüs aşılarına örnektir. Rekombinant

sıtma aşısı paraziter aşılaradır.²³ Engerix™ (GlaxoSmithKline biologicals, USA)-B, rekombinant DNA aşısı hepatit B'ye karşı kullanılmaktadır. SmithKline firması tarafından geliştirilmiştir. AviPro®Megan® (Lohmann animal health international, USA) Vac 1, tavuklarda *salmonella* enfeksiyonuna karşı kullanılan Lohmann Animal Health [Elanco] firması tarafından üretilmiş rekombinant aşıdır.

Sentetik peptit aşılar: Enfeksiyon etkeninin immunojenik komponentlerini oluşturan proteinlerin kimyasal sentezi ile elde edilen peptitlerin aşı olarak kullanılmasıdır. Sentetik viral, sentetik bakteriyel ve sentetik paraziter aşılar bulunmaktadır.^{24,25} Mosquiriks™ (RTS,S/AS01 olarak da bilinir) sentetik peptit aşısı, Plasmodium falciparumdan kaynaklanan sıtmaya karşı özellikle altı haftalıktan 17 aylık çocukları koruyucu amaçla geliştirilmiş sıtma aşısıdır. Aşının içeriği hepatit B'ye karşı da koruyucudur. GlaxoSmithKline firması tarafından geliştirilmiştir.²⁶

Antiidiyotip antikor aşıları: Epitoplar gibi aktiviteye sahip olan maddelerin spesifik antikorlarla kilit anahtar ilişkisine dayalı olarak hazırlanan aşılarlardır. Bakteriyel, viral ve paraziter antiidiyotip antikor aşıları bulunmaktadır.^{27,28} Antiidiyotip aşı olarak üretilmiş olan anti-idiotypic cancer vaccine 3H1-Titan, (diğer isimleri 3H1; anti-idiotypic antibody 3H1; anti-idiotypic CEA antibody vaccine), Titan Pharmaceuticals tarafından göğüs kanseri, kolorektal kanser ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kullanılmaktadır.

Mutant aşılar: Enfeksiyon etkenlerinin genomlarında bulunan ve patojeniteyi sağlayan genin veya genlerin çıkarılmasıyla elde edilmiş ve virüslansları zayıflatılmış olan mutantların aşı olarak kullanılmasıdır.²⁹ Şarbon, verem [Bacillus calmette-guerin (bCG)] ve tavuk vebasası aşıları gibi aşılar örnek olarak verilebilir. Mutant aşılar aşıların tedavi edici amaçla kullanılması için tümöre karşı hücrel ve humoral immüniteyi harekete geçirci özellikleri bulunmaktadır. Terapötik tümör aşıların kapsamına çok antijenli preparatlar, saflaştırılmış proteinler, sentetik peptitler, gangliositler, viral ve plazmit esaslı rekombinant ürünler

ile antijen taşıyan lipozomlar girmektedir. Kont-raseptif aşılar, allerji aşıları, Alzheimer aşıları ve kansere karşı kullanılan aşılar ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.¹²

rDNA TAŞIYAN ÜRÜNLER

rDNA teknolojisi, DNA parçasının veya bir ürünü kodlayan genin özel yöntemlerle çıkarılıp bunun üretilmesi işlemidir. Üretilen materyal yeni bir bileşiktir ve bu rekombinant üründür. **Gen klonlaması:** Protein sentezini kodlayan önemli bir ürünün (bu ürün protein ise) sentezini kodlayan genin ait olduğu hücre (prokaryotik, ökaryotik hücre) genomundan veya kromozomundan özel yöntemlerle kesilerek çıkarılması ve bunun bir taşıyıcı DNA ile birleştirilerek prokaryotik veya ökaryotik alıcı bir hücreye transfer edilmesi ve bu alıcı hücrede genin ekspresyonunun sağlanmasıdır. Yani bir hücreden genin alınıp yeni bir hücrede çoğaltılmasıdır. rDNA teknolojisinde üç ana unsur vardır; verici hücre, taşıyıcı hücre (vektör), ve alıcı hücre.³⁰

rDNA teknolojisi ile ABD’de pazarlanan ürünlere bazı örnekler **epo**, faktör 8, koloni stimüle edici faktör [colony-stimulating factor (CSF)], hepatit B, insülin, insan büyüme faktörü, doku plazminojen aktivatörü olarak verilebilir.¹⁰

MONOKLONAL ANTİKOR İÇEREN ÜRÜNLER

B hücrelerinin tek bir klonundan meydana getirilen antikorlara monoklonal antikor denir. Monoklonal antikorlar sadece bir epitopa karşı reaksiyon gösteren antikorlardır. Lenfoid veya miyeloid hücreleri immünolojik yanıtın oluşturulmasından sorumludur. Lenfoid hücreleri içinde yer alan hücrelere “B lenfositleri” denir. B lenfositleri yüzeylerinde epitop denilen spesifik hücreler taşır. B lenfositleri vücuda bir antijen girdiğinde yabancı bileşiğin uyarım şiddetine bağlı olarak aktive olur ve ürerler. Yüzey özelliklerinde değişimler olur. Biz buna “blastogenaz (blastogenesis)” deriz. Aktivasyon sonucu bu hücrelerin bazıları antikor sentezleyen hücreler hâline gelirler. Bunlara plazmosit denir. Diğer kısımları bellek hücreleri olarak anılır. Vücutta B hücrelerinin uyarımları sonucu meydana gelen ve değişik aktiviteye sahip antikorlara

poliklonal antikorlar denir. Tek bir hücre ve bunun klonlanmasından meydana gelmişse monoklonal antikor denir.³¹

İmmünizasyon işlemi ve tekniğin uygulanması: İmmünizasyon olması için bir hayvan seçilmektedir. Genellikle kolay bulunması, ucuz olması gibi nedenlerden dolayı fare, sıçan, tavşan gibi hayvanlar tercih edilmektedir. Hangi antijene karşı monoklonal antikor oluşturulacaksa o antijen seçimi önemlidir. Antijen-antikor spesifitesinin belirlenmesi gerekmektedir. Bir adjuvan madde, hayvanın peritonuna enjekte edilir ve immunizasyon başlatılır. Beş-altı hayvanla deneme yapılır, hayvan ölebilir veya yanıt vermeyebilir. Enjektasyondan iki-altı gün sonra dalak çıkarılır ve dalak içindeki hücre süspansiyonlarına ayrılır, santrifüjlenir. Burada amaç, B ve T-lenfositlerinin hücre süspansiyonlarına ayrılmasını sağlamaktır. Yani antikor sentezleyecek olan hücreler ayrılmış olmaktadır. Sonra aynı tür hayvanda miyeloma hücreleri oluşturulur. Bu hücrelerin en önemli özelliği, kendileri antikor sentezleyemezler ama sonsuz üreyebilirler, yüksek oranda birleşme özelliği gösterirler. Burada önemli olan şey ortamda bir enzim eksiktir.

[Hypoxanthine- guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)]enzimi yoktur. Monoklonal antikor teknolojisi ile çok küçük miktarlardan binlerce, milyonlarca çoğaltmaktadır. Çoğaltma işlemi in vivo ya da in vitro olarak yapılabilir. İn vivo da hayvanın karın zarına hibridomalar enjekte edilip burada çoğaltılır. İn vitro da ise kültür şişeleri, biyoreaktörler veya fermantörler kullanılarak çoğaltılır.^{31,32}

MONOKLONAL ANTİKOR TEKNOLOJİSİNİN KULLANILDIĞI YERLER

Teşhis ve tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Teşhis: Kanser teşhisi, tümör tipinin belirlenmesi, doku ve hücre tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Parazit hastalıkların teşhisinde, HIV testinde, gebelik testinde, hepatit B testinde, kan donörlerinin rutin incelenmesinde kullanılmaktadır. Bazı ilaçlar kanda yüksek konsantrasyonlar ulaştıklarında çok zararlıdır. Bu ilaçların hastanın kanında sürekli kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu ilaçlara Fenobarbital, Teofilin, Digoksin, Fenitoin,

lityum tuzları gibi ilaçlar örnek olarak verilebilir. Bu ilaçlar uzun süre kullanıldıklarında kanda yüksek konsantrasyonlara ulaşır ve bu zararlı durum ise monoklonal antikör teknolojisi ile kontrol edilebilir.

Tedavide: Viral ve paraziter hastalıklarda, kanser tedavisinde, ilaçların hedeflendirilmesinde immün lipozomları ve immün konjugatları kullanılmaktadır. Kontraseptif amaçla ve enzim yetersizliğinde kullanılmaktadır.³¹

MONOKLONAL ANTİKORLARIN KLİNİKTE GIDA VE İLAÇ DAİRESİ TARAFINDAN ONAYLANMIŞ PREPARATLARINA BAZI ÖRNEKLER

OKT-3® (AntiCD₃, Muromonab CD₃): 1986 yılında böbrek transplantasyonunun reddinde kullanılmak üzere FDA'dan onay almıştır. 5 mL'lik ampullerde 5 mg antikör içermektedir. En çok renal ve hepatik transplantasyondan sonra organ reddini engellemek için kullanılmaktadır. Kardiyak hastalarda steroide direnç gösteren, steroid yanıtı alınamayan, akut yanıt alınamayan durumlarda kullanılmaktadır. Katı organ transplantasyonunda redleri engellemek için kullanılır. Kemik gelişmesinde bone marrow hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. FDA tarafından onaylanmış preparatı IgG 2 a olarak yer alır.^{33,34}

Reo-Pro (Abciximab®): FDA onaylı bir preparattır. Post koroner anjiyoplastik kombinasyonların tedavisinde onay almıştır. Antikörün Fab fragmentidir. Trombositlere bağlanır. Genelde Murine 7EC antikör olarak da bilinir. Trombosit agregasyonunun potent inhibitörüdür.

Panorex: FDA onaylı bir preparattır. Kolorektal kanser tedavisinde çok kullanılmaktadır.^{34,35}

DIAGNOSTİK (TEŞHİS) AMAÇLA KULLANILAN MONOKLONAL ANTİKORLARA ÖRNEKLER

Myocint®: Kardiyak görüntüleme ajanıdır. **OncoScint®:** Barsak, rektal kanserlerini takip etmek için kullanılır. **ProstaScint®:** Prostat kanserinde kullanılır. **CEA-Scan®:** Birçok tümör tipinde bulunan karsino embriyonik antijen [carcinoembryonic antigen (CEA)]'i belirlemede kullanılır. Tümör tipini ayırmada kullanılır.³⁶

TABLO 1: Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmış biyoteknolojik ürünlere örnekler.³⁸

| Jenerik adı | Marka adı | Terapötik endikasyonu (Ruhsatlanma yılı) |
|-----------------|---------------------------|--|
| İnsan insülini | Humulin® | Diyabet tedavisinde |
| Somatrem | Protropin® | Büyüme hormonu |
| İnterferon a2a | Roferon-®A | Tüylü hücreli lösemi ve AIDS ile ilgili kaposi sarkoma tedavisinde |
| İnterferon a2b | Intron-®A | Tüylü hücreli lösemi ve AIDS ile ilgili kaposi sarkoma tedavisinde |
| Muromonab-CD3 | Orthoclone OKT-3 | Böbrek transplantasyonunda organ reddini önlemede |
| Hepatit B aşısı | Engeriks™, Recombivaks HB | Hepatit B tedavisinde |
| Epoetin alfa | Procrit | Anemi tedavisinde |

İmmün lipozomlar: Monoklonal antikörlerin immün lipozom hâline getirilip hastaya verilmesidir. İmmün lipozomlar ilaçların hedeflendirilmesinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Ig'ler lipozomların sıvı ortamında inkübasyona tutulur. Sonra lipozomlar Ig'lere kovalent ve non kovalent bağlarla bağlanır. İmmün lipozom hedef hücreye ulaştıktan sonra lipozomdan etkin madde salınacak ve farmakolojik etki gösterecektir. İmmün lipozomlar teşhis amaçlı da kullanılmaktadır. Sintigrafik taramalarda Ag kompleksinin birikmesine bağlı olarak organda radyoaktiflik birikip birikmediğinin kontrolünde kullanılır.³⁷

FDA tarafından onaylanmış biyoteknolojik ürünlere örnekler Tablo 1'de görülmektedir.³⁸

Biyoteknolojik yöntemlerle üretilen ve dünyada en çok satılan 12 terapötik protein türü ilaç Tablo 2'de görülmektedir.¹¹

Avrupa Birliği Ülkelerinde Ruhsatlandırılmış Terapötik Proteinler

Avrupa Birliği ülkelerinde merkezi sistemle ruhsatlandırılmış olan terapötik proteinlere örnekler Tablo 3'te görülmektedir.¹⁰

Türkiye'de Ruhsatlı Terapötik Proteinler

Türkiye'de ruhsatlı terapötik proteinlere örnekler Tablo 4'te görülmektedir.¹¹

TABLO 2: Dünyada en çok satılan 12 terapötik protein türü ilaç.¹¹

| İlacın adı | Üretici firma | Geliştirici firma | Kullanım yeri |
|-----------------------|------------------|---------------------|--------------------------------------|
| Epogen® | Amgen | Amgen | Anemi |
| Procrit® | Amgen | Ortho Biotech | Anemi |
| Neupogen® | Amgen | Amgen | Nötropeni |
| Humulin® | Genentech | Eli Lilly | Diyabet |
| Engeriks™-B | Genentech | Smithkline Beecham | Hepatit B |
| Intron® A | Biogen | Schering-Plough | Bazı lösemi ve sarkomalar, Hepatit C |
| Kogenate® | Bayer Biological | Bayer Biological | Hemofili A |
| Genotropin® | Genentech | Pharmacia | Büyüme bozukluğu |
| Avoneks® | Biogen | Biogen | Multipl skleroz |
| Betaseron® | Chiron/Berlex | Berlex/Schering AG | Multiplskleroz |
| ReoPro® | Centocor | Eli Lilly, Centocor | Kalp iskemik komplikasyonları |
| Ceredase/ Cerezyme | Genzyme | Genzyme | Gaucher's hastalığı |

BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜNLERDE KULLANILAN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Biyoteknolojik ürünleri analiz etmek için çok değişik yöntemler kullanılabilir.³⁹

ELEKTROFOREZ

Bir elektrik akımı altında yüklerin hareketleri sonucu oluşan olaydır. Bu yöntemin amacı peptit ve proteinlerde bulunan yüklerin kontrolüdür. Amino asitlerin, küçük moleküllerin, nükleotidlerin, proteinlerin, DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin ayırılmasında en çok kullanılan yöntemdir. Moleküllerin üzerindeki yük, ortamın pH'sine bağlı olarak değişeceğinden elektroforetik hareket ortam pH'sinden etkilenir. Elektroforez yöntemi çok hassas bir yöntemdir; küçük miktarlarda analiz yapabilir, proteinlerin yapısını bozmaz, ayrılacak maddeler aynı değerde yük taşıyor olsalar bile büyüklükleri ve biçimleri hareket hızlarını etkilediğinden ayrılmaları sağlanabilir. Yük taşıyan iyonik maddelerin üzerindeki yük değerleri ortam pH'sine göre ayarlanabilir. Elektroforez yönteminde mutlaka destek materyali kullanılmalıdır. Destek materyali olarak kâğıt, selüloz, asetat, jel gibi maddeler

kullanılır. Destek materyali olarak birbirinden ayrılacak moleküllerle reaksiyona girmeyen, hidrofil özellikte katı ve jel maddeler kullanılabilir. Destek materyalinin gözenekli yapıya sahip olması ve gözenekli yapıdaki kanallar içinde hareket etmesi gerekmektedir.⁴⁰

Elektroforez yöntemleri arasında poliakrilik asit jel elektroforezi [polyacrylamide gelectrophoresis (PAGE)], izotakoforez, sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi [sodium dodecyl sulfate (SDS)]-PAGE, izoelektrik odaklama, kapiller elektroforezi, zone elektroforezi gibi değişik yöntemler bulunmaktadır.

Poliakrilik asitjel elektroforezi yöntemi: En çok kullanılan yöntemdir, Akrilamit monomerlerinin polimerizasyonu sonucu poliakrilamit jel meydana gelir. Jel bileşimi genellikle %t olarak tanımlanır. %t ise total ve çapraz bağlı ajan miktarının bileşimi şeklinde tanımlanır. %t=total akrilamit monomer+çapraz bağlı ajan olarak tanımlanır. PAGE'de bir tampon sistemi seçilir. Jeller iki plaka arasında düzlemsel olarak hazırlanabilir. Aynı anda birden fazla örnekle de inceleme yapılabilir. Genellikle kullanılan tamponun pH'si 9 civarındadır.⁴⁰

Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi Yöntemi: SDS bir yüzey etkin madde özelliğindedir. SDS denatüre olmuş proteinlere bağlanarak onları çubuk şeklinde tutmaya çalışır. Burada proteinler SDS'ye mutlaka bağlanmalıdır. Genelde bütün proteinler aynı anda SDS'ye bağlanırlar. 1,4 g SDS/g proteindir. SDS'ye bağlanan proteinler negatif yüklüdür. Bu yöntemle molekül ağırlıkları tayini de yapılabilir. Ağırlığı bilinen moleküllerin mobilitesi hesaplanarak oluşturulan, standart grafik kullanarak bilinmeyen moleküllerin molekül ağırlıkları hesaplanabilir. Bu yöntemde sistemi sınırlandıran bazı faktörler bulunmaktadır. Bağlama kapasitesi vardır, belli bir değerini bağlamazlar. SDS-protein kompleksi elektrik yüklerinin göçü sırasında yüksek molekül ağırlığına sahip bir kütle oluşturabilir.^{40,41}

İzoelektrik odaklama yöntemi: Amino asitlerin izoelektrik noktalarına göre ayırım yapılmaktadır. pH'ye bağlıdır, eğer net pozitif yük taşıyan peptitin pH'si izoelektrik noktadan küçükse izoelektrik zona doğru bir hareket oluşur.⁴²

TABLO 3: Avrupa Birliği ülkelerinde ruhsatlandırılmış terapötik proteinler.¹⁰

| Jenerik adı | Marka adı | İmalatçı firma | Üretim sistemi | Terapötik endikasyonu (ruhsatlanma yılı) |
|--|--------------------|---------------------|---------------------------------|---|
| Rekombinant kan faktörleri ve benzerleri | | | | |
| Rh Factor IX | Benefix | Genetics Institute | CHO hücre | Hemofili B (1997) |
| Rh Factor VIII | Kogenate | Bayer | BHK hücre | Hemofili A (2000) |
| Rh Factor VIIa | NovoSeven | Novo-Nordisk | BHK hücre | Bazı hemofili formlarında (1995) |
| Rekombinant hormonlar | | | | |
| İnsülin lispro | Humalog | Eli Lilly | <i>Escherichia.coli</i> | Ağır sepsis (2002) |
| İnsülin Aspart | NovoRapid | Novo Nordisk | | Diabetes Mellitus (1999) |
| Rh-Glucagon | Glucagen | Novo Nordisk | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Hipoglisemi |
| Sitokinler | | | | |
| rIFN-a-2b | Intron A | Schering Plough | E.Coli | Kanser, genital siğiller, hepatit (2000) |
| Rh-EPO | Neorecormon | Boehringer-Mannheim | CHO | Anemi (1997) |
| RhIFN-β-1a | Rebif | Ares Serono | CHO | Multipl skleroz (1998) |
| Aşılar | | | | |
| HBsAg içeren kombine aşılar | Tritanrix-HB | Smithkline Beecham | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Hepatit B, difteri, tetanoz ve boğmacaya karşı aşı (1996) |
| rHBsAg içeren combine aşılar | Ambirix | Glaxo Smithkline | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Hepatit A ve Hepatit B'ye karşı aşı (2002) |
| rHBsAg içeren combine aşılar | Hexavac | Pasteur Merieux MSD | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Difteri, tetanoz, boğmaca, hepatit B, polio, Haemophilusinfluenza tip b'ye karşı aşı (2000) |
| Pasteurella multocidadan modifiye edilmiş toksini içeren kombine aşı | Porcilis AR-T DF | İntervet | | Maya domuzların aktif bağışıklamada (2000) |
| r klasik domuz ateşi virüsü antijeni içeren aşılar | Bayovac CSF E2 | Bayer | Böcek hücre hattı | Klasik domuz vebasına karşı domuz aşısı (2001) |
| Monoklonal antikor | | | | |
| Daclizumab | Zenapax | Hoffman La Roche | CEA | Anti-IL-2 reseptör, akut böbrek transplantasyonunda organ reddini önlemede (1999) |
| Basiliksmab | Simulect | Novartis | | Anti-IL-2 reseptör, allojenik böbrek transplantasyonunda organ reddini önlemede (1998) |
| Terapötik enzimler ve diğer ilave ürünler | | | | |
| rβ-glucocerebrosidase | Cerezyme | Genzyme | <i>Escherichia Coli</i> | Gaucher's hastalığı tedavisinde (1997) |
| Rh α-galactosidase | Fabrazyme | | Genzyme | Fabry hastalığı tedavisinde (2001) |
| rhOsteogenic protein-1:BMP | Osteogenic protein | CHO | Howmedica (EU) | Tibia hastalığı tedavisinde (2001) |

CHO: Chinese hamster ovary cell; BHK: Baby hamster kidney cell; CEA: Human carcinoembryonic antigen.

İzotakofrez (İsotachophoresis): Moleküldeki iyonik kısımların ayrılmasını sağlar, çok küçük miktarlarda ölçüm yapılabilir.⁴²

Kapiller elektroforez yöntemi: Sık kullanılan yöntemlerden biridir. Ayrım işlemleri kapiller içinde yapılır, kapiller içinde oluşan zona bağlıdır. Moleküllerin hareketini elektroozmotik akımlar sağlar.⁴²

■ SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER

Spektrofotometrik yöntemlerden, Ultra viyole (UV) spektrofotometresi, floresans spektrofotometresi, infrared (IR) spektrofotometresi, fourier transform infrared [fourier transform infrared (FT-IR)] spektrofotometresi gibi yöntemler kullanılmaktadır.⁴³

TABLO 4: Türkiye'de ruhsatlı terapötik proteinler.¹¹

| Jenerik adı | Marka adı | İmalatçı firma | Türkiye ruhsatı | Üretim sistemi |
|-----------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|
| İnterferonlar | | | | |
| İnterferon alfa-2a | Roferon A® | Roche | Roche | <i>Esherichia coli</i> |
| İnterferon alfa-2b | Intron A® | Schering | Schering-Plough | <i>Esherichia coli</i> |
| İnterferon beta-1a | Avonex® | Biogen | Biogen | CHO |
| İnterferon beta-1a | Rebif® | Serono | Serono | CHO |
| İnterferon beta-1b | Betaferon® | Schering | Schering | |
| Eritropoetinler | | | | |
| Epoetin alfa | Epreks® | Johnson&Johnson | Santa-Farma | CHO |
| Eritropoetin beta | Epreks® | Roche | Roche | |
| İnsülin ve analogları | | | | |
| İnsan insülini | Humulin® | Eli Lilly | Eli Lilly | <i>Esherichia coli</i> |
| İnsan insülini | Novolin® | Novo Nordisk | Novo Nordisk | <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> |
| İnsülin lispro (analog) | Humalog® | Eli Lilly | Eli Lilly | <i>Esherichia coli</i> |
| İnsülin aspart (analog) | NovoLog® | Novo Nordisk | Novo Nordisk | <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> |
| Büyüme hormonları | | | | |
| Somatropin | Humatrope® | Eli Lilly | Eli Lilly | <i>Esherichia coli</i> |
| Somatropin | Genotropin® | Pharmacia | Pharmacia | <i>Esherichia coli</i> |
| Somatropin | Norditropin® | Novo Nordisk | Novo Nordisk | <i>Esherichia coli</i> |
| Somatropin | Saizen® | Serono | Serono | Fare C127 |
| Koloni-stimülant faktörler | | | | |
| Filgrastim (G-CSF) | Neupogen® | Amgen | Roche | <i>Esherichia coli</i> |
| Monoklonal antikorlar | | | | |
| Muromonab-CD3 | Orthoclone OKT®-3 | OrthoBiotech | Santa-Farma | Hibridoma |
| Daclizumab | Zenapaks® | Hoffman-Roche | Roche | Hibridoma |
| İnfliximab | Remicade® | Centacor | Schering-Plough | Hibridoma |
| Palivizumab | Synagis® | MedImmune | Abbott | M.hayvan hücre |
| Diğerleri | | | | |
| Folitropin alfa | Gonal-F® | Serono | Serono | CHO |
| Folitropin beta | Puregon® | Organon | Organon | CHO |
| Glucagon | GlucaGen® | Novo Nordisk | Novo Nordisk | <i>S.Cerevisiae</i> |
| Dornase alfa (DNase) | Pulmozyme® | Genentech | Roche | CHO |
| Drotrocogin alfa (prot.C) | Ksigris® | Eli Lilly | Eli Lilly | İnsan hücre dizisi |

CHO: Chinese hamster ovary cell.

Ultraviyole spektrofotometresi: Proteinler 175-350 nm dalga boyunda net bir absorbands verirler. Disülfür bağları 250-300 nm aralığında absorbands verir, peptit bağının karbonil grubu 190-210 nm arasında absorbands verir.

Floresans spektrofotometresi: Aromatik aminoasitlerin floresans özelliklerine göre ölçüm yapılır. Tirozin, triptofan, fenil gibi gruplar floresans özellik gösterirler. Floresansın şiddetine göre ölçüm yapılır. Genellikle 300-400 nm arasında ölçüm yapılır. Floresans yöntemi proteinlerin kon-

formasyonel değişimlerini incelemede, birincil, ikincil, üçüncül yapılarını tayin etmede, katlanmamış bir proteini belirlemede, peptit protein etkileşmesini incelemede kullanılır.⁴⁴

Infrared spektrofotometresi: Bu yöntemde önemli olan bağ enerjileridir. Bağların tipi incelenir, proteinlerin konformasyonel değişimleri incelenir, ancak proteinlerin içerisindeki su moleküllerinin kuvvetli absorbe olmalarından dolayı yöntem her zaman doğru sonuç vermez. Diğer yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.⁴³

Fourier transform infrared spektrofotometresi: Peptit-peptit, peptit-protein hidrofobik etkileşmelerinde kullanılır. Çok küçük miktarlarda ölçüm yapılabilir. Yapı aydınlatmada kullanılmaktadır.⁴³

Dairesel dikroizm (Circular dichroism) spektroskopisi: Aminoasitler (glisin hariç) kiral karbon atomuna sahip yani asimmetriktirler.

Bu asimmetrik yapıları peptitlerin optik özelliklerini gösterir. Peptitlerin d ve l tiplerini, sirküler polarize ışık ile etkileşmesi sonucu inceleriz. Polarize ışığı çevirme oranlarına göre değerlendirilirler. Işığı sağa sola çevirmeleri ile optik özellikleri saptanır. Proteinlerin konformasyonel yapısını inceleyen hassas bir yöntemdir.^{43,45}

Light scattering (ışık saçılımı yöntemi): Çözünmeyen agregat oluşumlarında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin önemli avantajı seyreltme yapmadan analiz yapılabilmesidir. Yöntem partikül büyüklüğü analizinde kullanılmaktadır. Bu yöntemle misel, agregat oluşumları incelenebilir. Işık saçılımı yönteminde ışığın yansımaya bağlı olarak ölçüm yapılabilir. Seyreltik kolloidal sistem üzerine lazer ışığı gönderildiğinde her bir partikülden ışık saçılır. Dağılan her bir ışığın dalgaları birleşir veya birbirini etkiler. Uzaktaki küçük bir delikte net bir saçılım yoğunluğu oluşur. Bu yoğunluk foton toplayan tüp dedektörlerinde ölçülür. Kolloidal partiküller Brown hareketlerine bağlı olarak titreşir ve saçılım yaparlar.⁴⁶

KOLORİMETRİK YÖNTEMLER

Kolorimetrik yöntemlerde, proteinlerin amino asit grupları ile bazı maddeler reaksiyona girerek absorbans verirler.⁴⁷

Lowry yöntemi: Bu yöntem Folin-Ciocalteu (fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisi) reaktifinin alkali koşullarda proteinlerin fenolik amino asitleriyle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. İlk olarak peptit bağları ile Cu^{+2} arasında biüret reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır elde edilir. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifi tirozin ve triptofan amino asitleriyle reaksiyona girerek indirgenmektedir. Bu reaksiyon sonucu 600- 800 nm (maksimum 750 nm)

arasında absorbans veren mavi renkli heteropolimolibden kompleksi oluşmaktadır.⁴⁸

Bradford yöntemi: Proteinlerin boyalarla verdiği reaksiyona dayanan yöntemlerden en çok tercih edilenidir. Bu teknikte, yapısında (-) yükler içeren bir boya Coomassie Brilliant Blue G-250 (BG-250) proteinlerin (+) yüklerine bağlanmaktadır. Küçük peptitler veya amino asitler reaksiyona girmemektedir. Normalde kırmızı renk olan BG-250 reaksiyon sonucu oluşan mavi renge dönüşerek 595 nm dalga boyunda absorbans vermektedir. Yöntem duyarlılığı 0,05-1,4 mg/mL arasındadır. Bilinen klasik yöntemler içerisinde en kısa reaksiyon süresine sahip olan yöntem Bradford yöntemidir.⁴⁹

Ultraviyole 280 nm absorpsiyon yöntemi: Proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre protein miktarı ölçülen yöntemlerden bir tanesidir. Proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitleri nedeni ile 280 nm'de maksimum absorbans gösterir. Duyarlılığı 0,05-2,0 mg/mL aralığındadır. Buna karşın 280 nm'de absorbans yapabilecek bir organik bileşiklerin varlığında hassasiyet düşmektedir.⁵⁰

Ultraviyole 220 absorbans yöntemi: 220 nm dalga boyundaki absorbans peptit bağlarının elektronik geçişlerinden dolayı gerçekleşir.⁵⁰

Bikinkoninik asit yöntemi: Lowry yöntemi gibi bakır ile şelat oluşumuna dayalı bir yöntemdir ve reaktif olarak bikinkoninik asit [bichinoninic acid (BCA)] kullanılır. İlk basamak reaksiyonda proteinler Biüret reaktifi ile Cu^{+2} den Cu^{+1} indirgenir ve ikinci basamakta Cu^{+1} in BCA ile oluşturduğu kompleksin absorbansı 562 nm'de ölçülmektedir.⁵¹

Biüret yöntemi: Proteinler trikloroasetik asit ile çöktürülüp ve santrifüj edildikten sonra alkali çözelti içerisine alınmıştır. Bu karışım üzerine $CuSO_4$ ilave edildiğinde renk değişimi olmuştur. Günümüzde kullanılan biüret testinin temeli de Cu^{+2} iyonlarının bazik çözeltide peptit azotlarına bağlanması sonucu 540 – 560 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren renkli bir şelat kompleks oluşumuna dayanmaktadır. Protein ve peptitlerde iki peptit bağı oluşumuna katılan 4 azot atomu ile biüret çözeltisindeki Cu^{2+} 'nin renkli kompleks oluşturması esastır.⁵²

KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi [high-performance liquid chromatography (HPLC)], ters faz HPLC yöntemi, gaz kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi, size exclusion (permeasyon) kromatografisi gibi yöntemlerle protein miktar tayinleri ve ayırma işlemleri yapılmaktadır. Konformasyonel değişimler ve etkileşimler incelenip stabilite çalışmaları yapılabilmektedir. Kromatografik yöntemler oldukça hassas yöntemlerdir. Tekrarlanabilir sonuçlar vermektedirler.^{43,53}

İMMÜNOLOJİK YÖNTEMLER

Radyo immuno assay [(RIA)-Radyoaktif işaretli antijen ile antikor miktar tayini], immüno radyometrik yöntem [Immuno radiometric (IRMA)-radyoaktif işaretli antikor ile antijen miktarı bulunur], immuno histokimyasal (reseptöre bağlanma ölçülür), ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, floresan immuno assay, polimeraz zincir reaksiyonlar [Polymerase chain reaction (PCR)] gibi değişik yöntemler kullanılabilir.

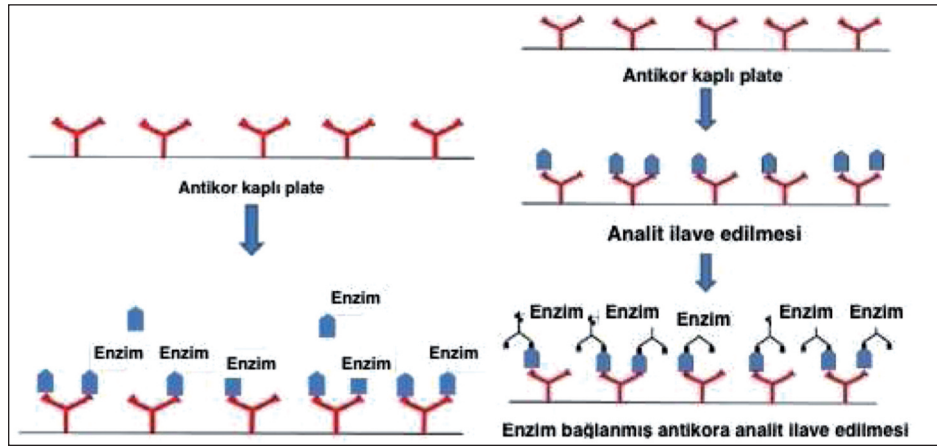
Radio immuno assay yönteminde: RIA'da temel mekanizma bir radyoizotop kullanarak canlı serum, doku ve organlardaki antijen veya antikorun varlığını ve miktarını saptamaktır. Bir izotopla işaretlenmiş antijenin işaretlenmemiş antijenle yarışarak antikora bağlanmasıdır. RIA yönteminde analiz edilecek madde saf olmalı, immünojenik özellik göstermeli ve, radyoizotopla işaretlenebilir olmalıdır. Burada afinite katsayısı çok önemlidir. Afinite katsayısı, antijenin antikora bağlanma ilişkisini göstermektedir.⁵⁴ En fazla kullanılan madde radyoaktif iyottur (125I veya 131I). Kompetisyon mekanizmasına dayalı (RIA) ve sandwich yöntemi şeklinde (IRMA) uygulanabilir. Bu yöntemle pikomolar konsantrasyonlarda hormonlar, plazma proteinleri, koagülasyon faktörleri ve izo enzimler ölçülebilir. Ölçüm tüpündeki antikor-antijen kompleksinin radyoaktivitesi bir gama sayacı kullanılarak ölçülür. Serum örneğinde aranan antijen az ise gama sayacında yüksek düzeyde okuma elde edilir; serum örneğinde aranan antijen fazlaysa gama sa-

yacında düşük düzeyde okuma elde edilir. Standart inhibisyon eğrisi kullanılarak miktar tayini yapılır.

Immuno radiometric assay yöntemi: Serumda varlığı araştırılan antijene özgül antikor katı faza (plastik veya polistren tüpün iç yüzeyi) bağlanmıştır. Tüp içerisine serum örneği eklenir ve bir süre inkübasyona bırakılır. Bu sürede varsa serumdaki antijenler antikorlara bağlanır; antikor-antijen kompleksi oluşur. İnkübasyondan sonra yıkama ile antikor-antijen kompleksi dışındaki maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Yıkama işlemi sonrası tüpe aynı antijene özgül ve radyoizotop işaretli antikor (antikor) eklenerek inkübe edilir. İnkübasyon süresince radyoizotop işaretli antikor, katı fazdaki antikor aracılığı ile tutulmuş olan antijene bağlanır; antikor-antijen-antikor kompleksi oluşur. İnkübasyondan sonra yıkama ile çözeltideki antikor-antijen-antikor kompleksi dışındaki maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Ölçüm tüpündeki antikor-antijen-antikor kompleksinin radyoaktivitesi bir gama sayacı kullanılarak ölçülür. Gama sayacında okunan değer, serum örneğindeki antijen miktarı ile ilişkilidir. Standart eğri kullanılarak miktar tayini yapılır. IRMA yöntemi, RIA'ya göre daha hızlı ve daha duyarlıdır.⁵⁴

ELISA yöntemi: Özgül antijen-antikor etkileşiminde antikorlara enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir. Antikor çifti kullanılır. İkinci antikor bir enzime sahiptir. Bu enzim horradish peroksidaz, alkalın fosfataz gibi enzimlerdir. Renk reaksiyonu verecek maddeler ikinci antikora bağlıdır. Antijenle doğrudan renk reaksiyonu verir. Renk şiddeti madde miktarı ile orantılıdır.

ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını, özgül antijen kullanılarak örnekteki antikorun miktarını ölçebiliriz. ELISA yöntemi, çeşitli şekillerde uygulanabilir. ELISA yönteminin şematik gösterimi Şekil 1'de görülmektedir. Kompetitif ölçümde tüpte bir katı destek üzerine bir antijen veya antikor adsorbe edilmiştir (immobilize antijen veya antikor). Ölçüm tüpüne serum (işaretsiz ligand içerir) ve reaktif (enzim işaretli ligand içerir) pipetlenir.^{54,56}



ŞEKİL 1: Antikor kaplı platete enzim bağlanması ve enzim bağlanmış antikora analit ilave edilmesi.⁵⁵

Kısa inkübasyon süresince immobilize antijen veya antikora bağlanmak için işaretli ligand ile enzim işaretli ligand yarışır; antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand kompleksleri oluşur. Yıkama ile antijen (veya antikor)-işaretsiz ligand ve antijen (veya antikor)-enzim işaretli ligand kompleksleri dışındaki ürünler ortamdaki uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu endpoint veya kinetik ölçümle izlenerek ölçülür. Renkli ürün oluşumu, işaretli ligandın (serumdaki antijen veya antikor) konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Sandviç yönteminde (kompetatif olmayan) ELISA yönteminde polistren ölçüm tüplerinin iç duvarına antijene ait spesifik antikorlar fazla miktarda adsorbe edilmiştir (immobilize antikorlar).

Ölçüm tüpüne örnek pipetlenir. inkübasyon süresince örnekteki antijenlerin hepsi immobilize antikorlar tarafından bağlanır; antikor-antijen kompleksleri oluşur. Yıkama ile antikor-antijen kompleksleri dışındaki maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Ölçüm tüpüne reaktif (enzim işaretli antikor içerir) pipetlenir. İkinci inkübasyon süresince primer antikor-antijen-enzim işaretli antikor kompleksi oluşur. Yıkama ile primer antikor-antijen-enzim işaretli antikor kompleksi dışındaki maddeler ortamdaki uzaklaştırılır. Enzimin substratı ortama eklenir. Renkli ürün oluşumu endpoint veya kinetik ölçümle izlenerek ölçülür. Renkli ürün oluşumu, işaretli ligandın (serumdaki

antijen veya antikor) konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Standart grafikten konsantrasyon belirlenir.^{54,56}

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi: DNA tayınlarda ve DNA izolasyonunda kullanılmaktadır.⁵⁷ Bu yöntemde nükleik asit amplifikasyon teknolojisi de denilmektedir. DNA örneğindeki özgün bölgeler çoğaltılarak elektroforezi yapılır, buna hedef çoğaltma yöntemi denilmektedir. Basit bir şekilde tüpte nükleik asitlerin uygun şekilde çoğaltılmasıdır. Numune olarak total DNA proteini, bir damla kan, saç kılı kökü, birkaç hücre, serum gibi maddeler kullanılabilir.

üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürün miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır.

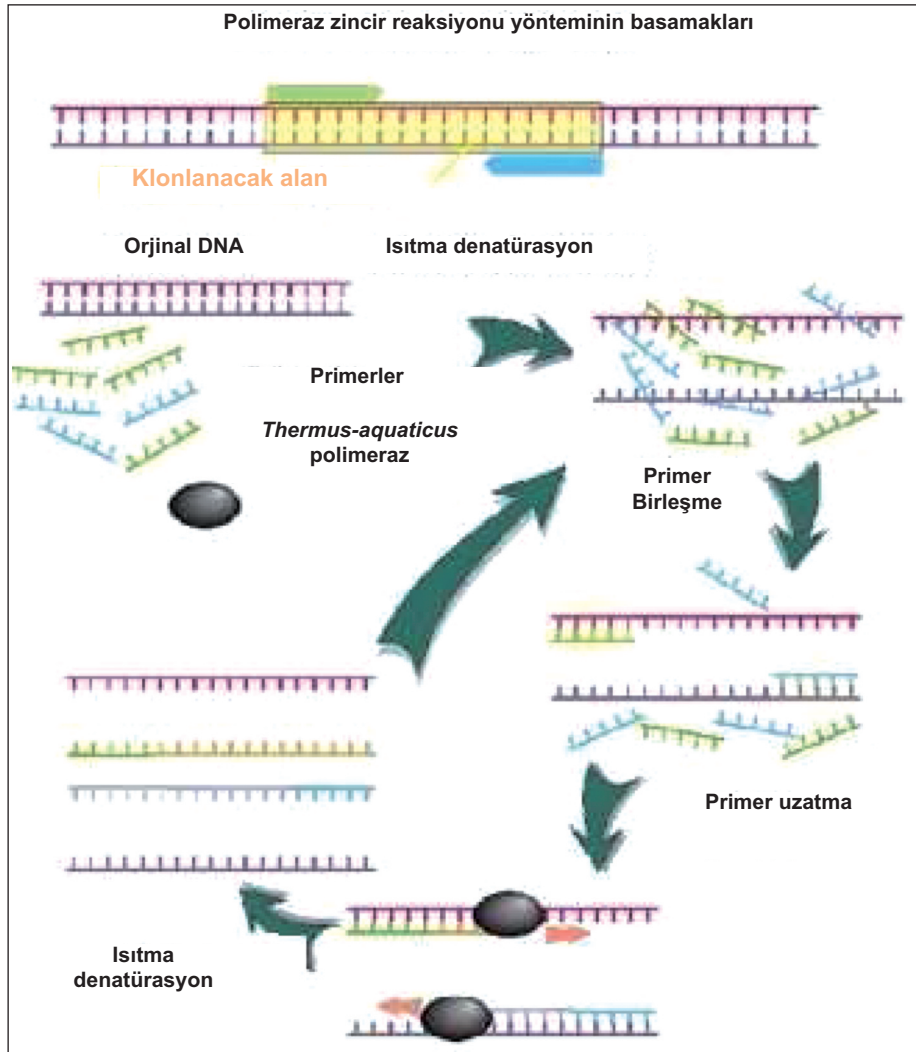
Denatürasyon (90-95 °C),

Primer bağlanma (50-70 °C),

DNA sentezi (70-75 °C),

Bu üç adım bir PCR siklusunu oluşturur. PCR yönteminin oluşum basamakları Şekil 2'de görülmektedir.

Çoğaltılması istenen DNA örneği, DNA replikasyonu için gereken maddeler ile birlikte üç değişik sıcaklıkta bir döngü içinde tutulur. Denatürasyon işleminde 91-94 °C'ye kadar ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Birleşme aşamasında ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA dizisini spesifik olarak tanıyan iki primer sıcaklığın 55-70°C'ye düşürülmesiyle birbirin-



ŞEKİL 1: Polimeraz zincir reaksiyonu CR yönteminin basamakları. (<http://kem-en-tec-nordic.com/pcr-page/>)

den ayrılmış olan kalıp DNA'daki tek zincirlere bağlanır. Uzama aşamasında ise ortama konmuş ve optimum çalışma sıcaklığı 70°C'de olan bir *Thermus-aquaticus* denilen (Taq) polimerazı veya sıcaklığa dayanıklı başka bir polimerazla bu sıcaklıklarda polimerlerden başlayarak DNA sentezi yapılır. Üç basamaklı bir döngü oluşur ve her tekrarlanışında spesifik DNA parçası iki katına çıkarılır. Sentezlenen DNA bir sonrakinde kalıp görevi yapar.^{58,59}

Ayrıca ışık saçılımı, X ışını kırınımı gibi yöntemlerde kullanılmaktadır.

SONUÇ olarak bu çalışmada; biyoteknolojinin amacı, önemi, kullanım alanları hakkında kısa bir bilgi verildikten sonra biyoteknolojik yöntemlerle

üretilecek maddelere örnekler verilmiştir. Biyoteknolojik olarak üretilen maddelerin analizinde kullanılan yöntemlerden kısaca bahsedilmiştir. Biyoteknolojik ürünlerin tüm dünyada üretimleri giderek artmaktadır. Sentetik olarak üretilmiş ürünler yerine biyoteknolojik yöntemlerle üretilmiş ürünler tercih edilmektedir. Ülkemizde de biyoteknolojik ilaçların üretilmesi için firmalar çeşitli girişimler ve yatırımlar yapmaktadır. Çok yakında Türk ilaç sanayiinde üretilmiş biyoteknolojik ürünler marketlerde yerini alacaktır. Böylece hedefe yönelik tedaviler yapılabilecektir. Her hastanın genetik bilgisine göre özel ilaç tasarlanması ve hazırlanması mümkün olacaktır. Böylelikle etkin ve faydalı bir tedavi gerçekleştirilecektir.

KAYNAKLAR

1. Ratledge C, Kristiansen B. Public perception of biotechnology. *Basic Biotechnology*. 2nd ed. United Kingdom: Cambridge University Press; 2001. p.3-18.
2. Bambakidis-Hellman K. Biotechnology regulatory policy for biomedical products-the United-States perspective. *Current Science* 1992;63(3):123-6.
3. Crommelin DJA. Formulation of biotech products, including biopharmaceutical considerations. In: Crommelin DJA, Sindelar RD, eds. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis; 2002. p.67-95.
4. Walsh G. *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. (Protein structure, Protein sources, Protein purification and characterization). 2nd ed. Chichester [u.a.]: John Wiley & Sons; 2002. p.1-100.
5. Walsh G, Headon DR, Headon D. *Protein Biotechnology*. 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons; 1994. p.382.
6. Degim IT, Celebi N. Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Des* 2007; 13(1):99-117.
7. Pasquali I, Bettini R. Are pharmaceuticals really going supercritical? *Int J Pharm* 2008;364(2): 176-87.
8. Glick BR, Pasternak JJ, Patten CL. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. (Fundamentals of molecular biotechnology). 4th ed. New York: American Society for Microbiology; 2010. p.1-329.
9. Scopes RK. *Protein Purification: Principles and Practice*. (The Protein Purification Laboratory) 3rd ed. New York: Springer Verlag; 1994. p.1-17.
10. Walsh G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;55(1):3-10.
11. Ommat R. *Vademecum-Modern ilaç Rehberi+Atc Index*. 24. Baskı. Ankara: Pelikan Yayınevi; 2015. p.246-1104.
12. Steinberg F, Raso J. Biotech pharmaceuticals and biotherapy: an overview. *J Pharm Pharm Sci* 1998;1(2):48-59.
13. Sims J. Assessment of biotechnology products for therapeutic use. *Toxicol Lett* 2001;120 (1-3):59-66.
14. Celebi N, Cilek A, Atak A, Akbulut G. The effects of pulmonary administration of interleukin-2 liposomes on immune system in rats. *Eur J Pharmaceutical Sciences* 2009;38(1): 117-9.
15. Schultz I, Wurzel J, Meinel L. Drug delivery of Insulin-like growth factor I. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;97(Pt B):329-37.
16. Değim Z, Celebi N, Alemdaroglu C, Deveci M, Öztürk S, Özoğul C. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. *Int Wound J* 2011;8(4):343-54.
17. Thomas JA. Recent developments and perspectives of biotechnology-derived products. *Toxicology* 1995;105(1):7-22.
18. Hedayberdiyev H, Öner F. [Peptide-protein therapeutics produced by recombinant DNA technology]. *Fabad J Pharm Sci* 1997;22(1): 27-38.
19. Dayan AD. Safety evaluation of biological and biotechnology-derived medicines. *Toxicology* 1995;105(1):59-68.
20. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther* 2014;2:27.
21. Danzon PM, Nicholson S, Pereira NS. Productivity in pharmaceutical-biotechnology R&D: the role of experience and alliances. *J Health Econ* 2005;24(2):317-39.
22. Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* 2000;7(1):31-4.
23. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 2003;253(4):402-10.
24. Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(15):5409-13.
25. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 1998;4(3):321-7.
26. Tinto H, D'Alessandro U, Sorgho H, Valea I, Tahita MC, Kabore W, et al; RTS, S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS, S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* 2015;386 (9988):31-45.
27. Foon KA, Chakraborty M, John WJ, Sherratt A, Köhler H, Bhattacharya-Chatterjee M. Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic antibody vaccine. *J Clin Invest* 1995;96(1): 334-42.
28. Grzych JM, Capron M, Lambert PH, Dissous C, Torres S, Capron A. An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* 1985;316(6023):74-6.
29. Tang YW, Allawi HT, DeLeon-Carnes M, Li H, Dayc SP, Schmid S. Detection and differentiation of wild-type and vaccine mutant varicella-zoster viruses using an Invader Plus method. *J Clin Virol* 2007;40(2):129-34.
30. Malik VS. Recombinant DNA technology. *Adv Appl Microbiol* 1981;27:1-84.
31. Schmidt KV, Wood BA. Trends in cancer therapy: role of monoclonal antibodies. *Semin Oncol Nurs* 2003;19(3):169-79.
32. Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54(1):11-29.
33. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 1997;60(1):52-60.
34. Öner F. Drug carrier systems for biotechnology derived products. Atilla A, Hincal H, Süheyla Kaş, editörler. *Biomedical Science and Technology*. 1st ed. New York: Plenum Press; 1998. p.97-108.
35. Dillman RO. Monoclonal antibodies in the treatment of malignancy: basic concepts and recent developments. *Cancer Invest* 2001; 19(8):833-41.
36. Kim EE. Radio immuno detection of cancer. In: Kim EE, Yang DJ, eds. *Targeted Molecular Imaging in Oncology*. 1st ed. New York; London: Springer; 2001. p.88-101.
37. Hughes BJ, Kennel S, Lee R, Huang L. Monoclonal antibody targeting of liposomes to mouse lung in vivo. *Cancer Res* 1989;49(22): 6214-20.
38. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012;75(3):311-35.
39. Görög S. Identification in drug quality control and drug research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2015;69:114-22.
40. Dunbar BS. *Two-Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques*. 1st ed. New York: Plenum Press; 1987. p.372.
41. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1971; 252(3):1102-6.
42. Simpson DC, Smith RD. Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics. *Electrophoresis* 2005;26(7-8):1291-305.
43. Pelton JT, McLean LR. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem* 2000;277(2):167-76.
44. Steinberg SM, Poziomek EJ, Engelmann WH, Rogers KR. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere* 1995;30(11):2155-97.

45. Johnson WC Jr. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* 1990;7(3):205-14.
46. Wilson WW. Light scattering as a diagnostic for protein crystal growth-a practical approach. *J Struct Biol* 2003;142(1):56-65.
47. Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem* 1999;29(Pt 2):99-108.
48. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
49. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
50. Myers AB. Resonance raman intensity analysis of excited state dynamics. *Acc Chem Res* 1997;30(12):519-27.
51. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85.
52. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;177(2):751-66.
53. Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ, Gygi SP. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (lc/lc-ms/ms) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res* 2003;2(1):43-50.
54. Grange RD, Thompson JP, Lambert DG. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *Br J Anaesth* 2014;112(2):213-16.
55. Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S. Immunoassay methods. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al, eds. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.2012 May 1 [updated 2014 Dec 24].
56. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 1978;31(6):507-20.
57. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time Rt-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6(4):279-84.
58. Gachet E, Martin GG, Vigneau F, Meyer G. Detection of genetically modified organisms (gMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends In Food Science & Technology* 1999;9(11-12):380-8.
59. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.