



T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE İLAÇ VE
TIBBİ CİHAZ KURUMU

VİRAL VE BAKTERİYEL AJANLARA KARŞI İNSANLARDA KULLANIM AMAÇLI HAYVAN İMMÜNGLOBULİN / İMMÜN SERUMLARININ KLİNİK DIŞI DEĞERLENDİRİLMESİNE İLİŞKİN KILAVUZ

KAD-KLVZ-22

İlk Versiyon Yürürlük Tarihi	19.02.2021
1. Revizyon Yürürlük Tarihi	18.03.2024

İçindekiler

1. GİRİŞ	1
2. ÜRETİM, KARAKTERİZASYON VE KALİTE	2
2.1. Antijenin Hazırlanması	2
2.2. Üretim Sürecinde Kullanılacak Hayvanlar	2
2.3. Karantina Dönemi	3
2.4. Veterinerlik Bakımı ve Sağlık İzlemi	3
2.5. İmmünizasyon (Antijen Aşılması)	4
2.6. Kan/Plazma Toplanması ve Plazma Kabul Kriterleri	4
2.7. Havuzlama	5
2.8. Saflaştırma	5
2.9. Bitmiş Ürün	6
2.10. İyi İmalat Uygulamaları (İİU)	6
3. KLİNİK ÖNCESİ ÇALIŞMALAR	6
3.1. Primer/Sekonder Farmakodinamik Çalışmalar (Kavram Kanıt Çalışmaları)	6
3.2. Tek Doz Toksikite Çalışmaları	7
3.3. Tekrarlı Doz Toksikite Çalışmaları	7
3.4. Güvenlilik Farmakolojisi	8
3.5. Farmokinetik Çalışmalar	8
3.6. Lokal Tolerans Testi	8
3.7. Üreme ve Gelişimsel Toksikite Çalışmaları	8
3.8. Genotoksikite ve Karsinogenisite Çalışmaları	9
4. KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURULARI	9
5. YÜRÜRLÜK	9
6. YÜRÜTME	9
7. REFERANSLAR	9
Ek-1: İmmünglobulin / immün serum üretiminde kullanılan hayvanlarda görülen olası virüs çeşitleri	11
Ek-2: Hayvan kaynaklı immünglobulin / immün serum bitmiş ürün testleri	13

1. GİRİŞ

Bu kılavuz, viral ve bakteriyel ajanlara karşı insanlarda kullanım için hayvanlardan elde edilen immünglobulinlerin/immün serumların üretimi ve kalite kontrolü ile klinik dışı çalışmaları hakkında rehberlik sunmak üzere hazırlanmıştır.

İmmünglobulinlerin/immün serumların klinik gelişimi, klinik dışı çalışmalar ve klinik araştırmalardan oluşur. İmmünglobulin/immün serumlar için gerekli klinik dışı değerlendirmenin yapılması ve uygun sonuçların elde edilmesi, klinik araştırmaların başlatılabilmesi için bir ön koşuldur. Bununla birlikte immünglobulinlerin/immün serumların klinik dışı değerlendirmesi, ürün gelişiminin hem klinik araştırma öncesi hem de klinik araştırma aşamasında devam etmekte olup gerekli durumlarda klinik araştırmalar devam ederken de ek klinik dışı çalışmalar planlanmalıdır. Klinik dışı değerlendirme, immünglobulinlerin/immün serumların klinik gelişimi öncesinde ve esnasında yapılan tüm "in vivo" ve "in vitro" testleri ifade eder. Bu kılavuz kapsamında belirtilen gereklilikler yürütülecek klinik araştırmalar için geçerli olup tüm ruhsatlandırma gerekliliklerini kapsamamaktadır.

Klinik dışı çalışmaların birincil amacı, ürünün insanlar üzerinde araştırılabilmesi için uygun ve güvenli olduğunu göstermek olmalıdır. Klinik dışı gelişimde; üretimde kullanılan hayvanlar, immünizasyon için kullanılacak antijenler, ürün karakterizasyonu ve viral/mikrobiyal güvenlik dikkat edilmesi gereken konuların başında gelir. Klinik dışı çalışmalarda elde edilecek veriler immünglobulinlerin/immün serumların güvenliliği ve etkililiğinin değerlendirileceği klinik araştırma protokollerinin planlanmasına da yol gösterir. Klinik dışı çalışmalar yapılırken gerekli durumlarda biyogüvenlik koşulları sağlanmalı ve güvenlilik çalışmaları İyi Laboratuvar Uygulamalarına (İLU) [Good Laboratory Practice (GLP)]¹ uygun yapılmalıdır.

Hayvan kaynaklı immünglobulin/immün serum hazırlamak için genellikle tavşan, at, sığır, keçi ve koyun kullanılmaktadır. Hayvan serumları içerisinde bulunan proteinler, insan organizması için yabancı antijenler olup alerjik reaksiyonlara neden olabilirler. Hayvan serum veya plazmasının doğrudan insanlarda kullanılması önerilmez. Bu ürünler, immünize edilen hayvanların serum veya plazmalarından hazırlanır. İmmün serumda, immünglobulinler dışındaki serum komponentleri günümüz teknolojileri ile saflaştırılarak, saflaştırılmış immünglobulin elde edilmektedir. Bu ürünler farklı antikorlar kapsamına rağmen, özellikle hedef antijene karşı oluşan antikorlar yönünden zenginleştirilmektedir.

Yapılacak olan klinik dışı çalışmaların kapsamı immünglobulin / immün serumun türüne bağlıdır. Önceden elde edilmiş klinik dışı ve klinik verisi olmayan bir ürün için yapılacak klinik dışı çalışmaların, daha önce ruhsatlandırılmış ve insanlarda kullanılan ürünler için yapılacak klinik dışı çalışmalardan daha kapsamlı olması beklenir.

Klinik olmayan gelişim aşamaları ve çalışmalarda, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (World Health Organization – WHO), Uluslararası Uyum Konseyi (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use - ICH) ve Avrupa Birliğinin ilgili kılavuzları ve rehber dokümanları ile Avrupa ve Türk Farmakopeleri referans alınmalıdır.

123 no.lu Deney ve Diğer Bilimsel Amaçlarla Kullanılan Omurgalıların Korunmasına Dair Avrupa Sözleşmesi ve 13/12/2011 tarihli ve 28141 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik ve diğer ilgili mevzuat doğrultusunda ürünlerin klinik dışı gelişim aşamasında 3R ilkesine göre hareket edilmelidir.

¹ Bir tesisin İyi Laboratuvar Uygulamalarına uygunluğu, yetkili otorite tarafından sertifikalandırılmış olmalıdır.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	1 / 16

2. ÜRETİM, KARAKTERİZASYON VE KALİTE

İmmünglobulinlerin / immün serumların üretiminde, geliştirilen ürünün karakteristik özellikleri ve üretim basamakları ürün bazında değişkenlik gösterebilir. Ürünün kalitesinin değerlendirilmesi de bu nedenle üretim sürecindeki değişkenliklere doğrudan bağlıdır. Her ürünün kalitesi üretim basamakları göz önünde bulundurularak değerlendirilmeli ve doğrulanmalıdır.

Üretim özetle;

- antijenin hazırlanması,
- immünizasyon (antijen aşılama),
- kan/plazma toplanması,
- havuzlama,
- saflaştırma,
- formülasyon,
- dolum ve ambalajlama,

aşamalarından oluşmaktadır.

İmmünglobulin / immün serumların kalitesi ve güvenliliği sadece nihai ürünün test edilmesiyle sağlanamaz, kalite ve güvenlilik ancak İyi İmalat Uygulamaları (İİU) [*Good Manufacturing Practice (GMP)*]² ilkelerini izleyerek, üretim sürecinin sıkı kontrolüne bağlıdır. Biyolojik ürünlerin üretimi için geçerli olan gerekliliklerin birçoğu immünglobulin / immün serumların üretimi için de geçerlidir (İİU-GMP Kılavuzu Ek-1 ve Ek-2; WHO, *Technical Report Series 822, 1992: Annex 1 Good Manufacturing Practices for Biological Products*). Ayrıca immün serumlar için spesifik gereklilikler Dünya Sağlık Örgütü'nün 413 numaralı Teknik Raporlar Serisi Ek-2'sinde tanımlanmaktadır.

2.1. Antijenin Hazırlanması

İmmünglobulin / immün serum üretiminde rekombinant antijenler de dâhil olmak üzere farklı viral ve bakteriyel antijen tipleri kullanılabilir.

Antijenlerin elde edildiği kaynak ve özellikleri belgelendirilmelidir.

Antijenler, uygun şekilde karakterize edilmeli ve hazırlama yöntemleri hakkında bilgi verilerek belgelendirilmelidir.

Antijenin hazırlanmasında kullanılan besi yeri, hammadde ve yardımcı maddelere ait analiz sertifikaları, insan ve hayvan kaynaklı materyal kullanılıp kullanılmadığı belgelendirilmelidir.

Biyolojik kökenli malzemelerin, mikoplazma, mantarlar ve bakteriler gibi mikrobiyal kontaminantlar ile olası viral kontaminantlar yönünden ari ve steril olduğu testlerle kanıtlanmalıdır. Ayrıca, üretim prosedürü sırasında sığır serumları kullanılıyorsa, BSE, TSE, mikoplazma ve sığırlar için bulaşıcı hastalıklardan ari ve steril olduğu testlerle kanıtlanmış olmalıdır.

2.2. Üretim Sürecinde Kullanılacak Hayvanlar

İmmünglobulin / immün serum üretiminde genellikle tavşan, at, sığır, keçi ve koyun kullanılmaktadır.

Seçilen hayvanlar; hayvanların cinsi, boyutu, yaşı, sağlık durumu ve geçmişi ile ilgili özel seçim kriterlerine uymalıdır. Hayvanlar, ilgili ülkenin yetkili otoritesi (Türkiye için Tarım ve Orman Bakanlığı) tarafından ruhsatlandırılmış yasal üreticilerden temin edilmelidir. Ülkemiz için yasal üretici olmaması durumunda Tarım

² Bir tesisin İyi İmalat Uygulamalarına uygunluğu, yetkili otorite tarafından sertifikalandırılmış olmalıdır.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	2 / 16

ve Orman Bakanlığının hayvan kayıt sistemine kayıtlı hayvanlar da bu amaçla kullanılabilir ancak bu durumda karantina süresi uzatılmalıdır.

Her hayvan için, üretim programı boyunca bir "kayıt sistemi" oluşturulmalıdır. Hayvancılık, sağlık izlemi ve durumu, immünizasyon işlemi, kan/plazma toplama ve acil bakım dâhil olmak üzere tüm faaliyetler ve bilgiler bu kayıt sistemine kaydedilmeli ve belgelendirilmelidir. Tüm işlemler, önceden tanımlanmış standart operasyon prosedürlerine (SOP) göre yürütülmelidir.

2.3. Karantina Dönemi

Hayvanların, veteriner hekim muayenesine tabi tutuldukları, belirli hastalıklara karşı aşılandıkları, iç ve dış parazitler için tedavi edildikleri 6-12 haftalık bir karantina döneminden geçtiği belgelendirilmelidir.

Karantina tesisi, ana hayvan barınağı tesisinden ayrı ve yeterli uzaklıkta olmalıdır. Her tesis için bir "biyogüvenlik planı" uygulanmalıdır.

Yerel epidemiyolojik duruma bağlı olarak, hayvanlar ilgili ülkenin yetkili otoritesi tarafından belirlenmiş endemik hastalıklara karşı aşılanmalıdır. Hayvanlar, iç ve dış parazitleri ortadan kaldırmak için bir programdan geçmelidir. Tüm aşilar ve sağlık bilgileri hayvanın dosyasına kaydedilmeli ve belgelendirilmelidir.

Veteriner hekim muayenesi; tam bir fiziksel muayene ve ilgili hayvan türü için taranması zorunlu bulaşıcı hastalıklar için serolojik testleri içeren kan testlerini içermelidir.

Karantina döneminden sonra ilgili hayvanın sağlığı sorumlu veteriner hekim muayenesi ve kan parametreleri ile vücut durumu skoruna göre iyi durumdaysa; ilgili serolojik testlerin sonuçları negatifse, hayvan immünizasyon için kullanılan hayvan sürüsüne dâhil edilebilir.

2.4. Veterinerlik Bakımı ve Sağlık İzlemi

Hayvanlar, hayvan sağlığı ve refahı ile etik standartlardaki en iyi uygulamalara göre uygun şekilde barındırılmalı, beslenmeli ve yönetilmelidir. Üretimde kullanılan hayvanların, barınma, beslenme, bakım ve hastalıklardan korunma önlemleri, Tarım ve Orman Bakanlığının ilgili mevzuatında belirtilen koşulları sağlamalıdır.

Hayvanlarla çalışan tüm personel, hayvanlara bakmak için eğitilmiş ve kalifiye olmalıdır. Personelin eğitim kayıtları ve geçmişi belgelendirilmelidir.

Hayvanların belirli enfeksiyöz ajanlardan kurtulması amacıyla, sürekli ve sistematik olarak veterinerlik ve laboratuvar takibine tabi olmasını sağlayan düzenli bir "sağlık izleme sistemi" bulunmalıdır. Bu takip, hayvanların sorumlu veteriner hekim tarafından sürekli izlenmesini ve rutin klinik muayeneleri; hematokrit, hemogram, pıhtılaşma testleri gibi klinik laboratuvar testleri; virüs, bakteri ve parazitler için yapılacak serolojik analizleri; immünizasyonun ve büyük hacimlerde kan toplanmasının olası klinik etkileri açısından izlemi içermelidir.

Bir hayvan herhangi bir hastalık belirtisi gösterdiğinde, uygun veteriner hekim muayenesi ve tedavisini alabilmesi için aşılama programlarından geçici olarak çekilmelidir. Hastalık kontrol edilirse, hayvan uygun bir süre (genellikle 4 hafta) sonra aşılama programına dönebilir. Bir hayvan herhangi bir tür antibiyotik veya ilaç alıyorsa, söz konusu ilacın / ilaçların eliminasyon kinetiğine bağlı olan bir süre için aşılama programından çıkarılmalıdır. Aşılama durumunda bu arınma süresi 1 aydan kısa olmamalıdır. Hayvanlar penisilin içerikli antibiyotiklerle tedavi edilmemelidir.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	3 / 16

Hayvanlar için uygun fiziksel egzersiz ve rutin hayvancılık bakımı (tırnak bakımı, diş törpüleme vb.) sağlanmalıdır. Yemler kontrollü bir kaynaktan gelmeli, geniş getiren hayvanlardan elde edilen materyaller ve hayvansal protein içermemelidir.

Sağlık izleme sisteminin özellikleri, yapılan işlemler ve sağlık izlemesinin sonuçları detaylı olarak belgelendirilmelidir.

2.5. İmmünizasyon (Antijen Aşılama)

Üretim programında en iyi bağışıklık tepkisini ve plazma üretimini sağlamanın yanında optimal hayvan bakımını da sağlayabilen uygun aşılama programı (doz seçimi, katkı maddelerinin seçimi, aşılama yerleri ve kan/plazma toplama programı) belirlenmelidir.

Uygun olarak seçilmiş adjuvanların aşılama kullanımlarına izin verilebilir.

Her bir hayvanın antijene karşı bağışıklık tepkisi, aşılama programı boyunca izlenmelidir. Yeterli antikor titresinin oluştuğu geçerli testler ile belgelendirilmelidir.

Aşılama sürecinin izlenebilirliğini sağlamak amacıyla her aşılama aşamasının ayrıntıları tam olarak kaydedilmeli ve belgelendirilmelidir.

2.6. Kan/Plazma Toplanması ve Plazma Kabul Kriterleri

Aşılama bir hayvan gerekli spesifikasyonları karşılayan bir antikor titresini geliştirdiğinde, hayvanın klinik durumunun stabil ve kabul edilebilir olması; kan ve biyokimya parametrelerinin hayvanın türü ve cinsi için normal aralıkta olması koşuluyla, hayvandan kan alınabilir. Kan/plazma toplanmadan önce hayvanlar sorumlu veteriner hekim tarafından değerlendirilmeli, sağlıklı olduğu beyan edilerek belgelendirilmelidir.

Kan/plazma toplanması bu faaliyet için ayrılmış özel odalarda gerçekleştirilmelidir. Kan/plazma toplanması sırasında hayvanların sessiz bir ortamda olabildiğince güvenli ve rahat hale getirilmesi gerekir.

Venöz kan, eksternal juguler venden plazmaferez veya benzeri bir cihaz ile alınmalıdır.

Kan alırken asepsi kurallarına uyulmalı ve mikrobiyal kontaminasyon olmamalıdır.

Elde edilecek kanın hacmi, aşılama hayvanın türüne ve boyutuna bağlıdır. Kan/plazma alınan hayvanların klinik durumu, kan/plazma toplanması sırasında ve takip eden günlerde yakından izlenmelidir. Hayvan üzerinde herhangi bir olumsuz etki meydana gelmesi durumunda toplama işlemi durdurulmalıdır. Bir hayvan operasyon sırasında sıkıntı belirtileri gösterirse, toplama işlemi sonlandırılmalıdır.

Toplanan veya tam kandan ekstrakte edilen plazmalar etiketlenir. Bu plazmalara Türk ve Avrupa Farmakopelerinde izin verilen koruyucular uygun oranlarda katılabilir.

Plazma Kabul Kriterleri;

- Antikor titresini üretici kriteri ile uyumlu olmalıdır.
- Hiperimmün plazma, normal plazma görünümünde berrak olmalı, bulanıklık ve hemoliz olmamalıdır.
- Plazma, protein miktarı ve biyolojik yük (*bioburden*) yönüyle test edilmeli ve test sonucu üretici kriterine uygun olmalıdır.
- Viral, bakteriyel ve diğer patojenler yönünden kontaminasyon olmaması için üretici firma gerekli tedbirleri almalı ve kontaminasyon olmadığına dair sonuçlar belgelendirilmelidir.
- Virüs tespitine rağmen plazma üretime alınacaksa saflaştırma prosesine, ek viral inaktivasyon aşamaları eklenmelidir. Üretim sonrasında elde edilen ürün, ilgili kontaminasyon yönünden test edilmeli ve kontaminasyon olmadığına dair sonuçlar belgelendirilmelidir.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	4 / 16

2.7. Havuzlama

Ayrı ayrı hayvanlardan alınan plazmalar, fraksiyonlara ayrılmadan önce steril kaplarda havuzlanır.

Plazma kabul aşamasında yapılmıyorsa havuz, uygun *in vitro* ve gerekli ise *in vivo* testler kullanılarak spesifik virüslerin varlığı açısından test edilmelidir. Hangi virüslerin test edileceği üretim süreci ve ülkenin epidemiyolojik durumuna bağlıdır. Hayvanlarda tespit edilen virüs çeşitleri [Ek-1](#)'de yer almaktadır.

İstenmeyen antikorların emilmesi (absorpsiyonu) ve/veya aşılama için insan kanı kullanıldığında, insan virüslerinin (HCV, HIV 1/2 ve HBV) bulunmadığı gösterilmelidir.

Havuzlanmış plazmada viral kontaminasyon tespit edilirse, bu viral kontaminasyonun üretim sürecinde ortadan kaldırıldığı veya inaktive edildiği belgelendirilmelidir.

Fraksiyonasyondan önce, plazma havuzları makroskopik olarak belirgin çökeltiler, hemoliz ve bakteriyel kontaminasyon (biyolojik yük testi) açısından kontrol edilmelidir. Ek olarak, pirojenik maddeler ve toplam protein içeriği için testler de dâhil edilebilir.

Büyük plazma havuzları oluşturulmadan önce küçük plazma havuzlarının oluşturulması ve bu havuzların mikrobiyal kontaminasyon yönünden değerlendirilmesi önerilir. Kontaminasyon olmaması durumunda büyük havuzlar oluşturulabilir. Mikrobiyal kontaminasyon tespit edilmesi durumunda ise her bir hayvandan elde edilen plazmalar ayrı ayrı test edilerek kontamine plazma(lar) imha edilmelidir.

Mikrobiyal ve viral kontaminasyon testlerinin plazma kabulü veya havuzlama aşamasında yapılamaması durumunda bu testler bitmiş üründe yapılmalıdır.

2.8. Saflaştırma

Aşağıdaki etkin maddelerden birini elde etmek amacıyla saflaştırma/fraksiyonasyon prosesleri uygulanır:

- IgG molekülleri,
- F (ab')₂ fragmentleri,
- Fab fragmentleri.

Fraksiyonasyon prosedürleri, antikorların nötralize etme aktivitesini bozmamalı, kabul edilebilir fizikokimyasal özelliklere ve saflığa sahip bir ürün sağlamalıdır.

Parçalara ayrılacak bir plazma serisinin özellikleri açıkça belirlenmelidir. Etkin maddeyi saflaştırmak için kullanılan yöntemler ve proses içi kontroller, SOP'lerde ayrıntılı olarak açıklanmalıdır.

Saflığı göstermek için fizikokimyasal ve immünolojik teknikler dâhil olmak üzere mümkün olduğunca geniş bir test programı kullanılmalıdır.

Bulk ürünün biyolojik, fiziksel ve kimyasal özellikleri tanımlı spesifikasyonları karşılamalıdır. Bunun için aşağıdakiler analiz edilir:

- Etkililik ve potens,
- Saflık,
- Sterilite,
- İçeriğin tanımlı spesifikasyonlara uygunluğu,
- Endotoksin,
- Koruyucu konsantrasyonu,
- Yardımcı maddelerin konsantrasyonu,
- pH,

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	5 / 16

- Stabilité testleri.

Üretim sürecinin, viral güvenilirlik açısından virüsleri etkisiz hale getirmek veya ortadan kaldırmak ve viral yükü doğrulamak için en az iki basamak içermesi beklenir.

2.9. Bitmiş Ürün

En az 3 seri üretim yapılmalı ve üretim prosesi valide edilmelidir.

Tüm üretim prosesinin akış şemaları ve açıklamaları belgelendirilmelidir.

Bitmiş ürün [Ek-2](#)'de yer alan analizlere tabi tutulur. Analiz sonuçları belgelendirilmelidir.

Acil halk sağlığı durumlarında Faz I araştırmalara geçiş için 3 seri üretim ve proses validasyonu yapılmayabilir. Ancak Faz II araştırmalar öncesinde en az 3 seri üretim ve proses validasyonu tamamlanmalıdır.

2.10. İyi İmalat Uygulamaları (İİU)

Asgari olarak havuzlama, saflaştırma, formülasyon, kalite kontrol testleri ile dolun ve ambalajlama işlemleri yetkili otorite tarafından İİU (GMP) konusunda yetkilendirilmiş tesiste İİU (GMP) koşullarına uygun olarak yapılmalıdır.

3. KLİNİK ÖNCESİ ÇALIŞMALAR

Bu bölüm, immünglobulin / immün serumların klinik öncesi çalışmalarını tasarlamaya yönelik genel bir çerçeve sunmaktadır. Herhangi bir klinik öncesi çalışmanın tasarımı ürüne ve endikasyona özgü olduğundan, ürünlerin özelliklerine, hayvan modellerinin bulunabilirliğine ve metodolojilere göre bu bölümde belirtilen genel çerçevede değişiklikler gerekli olabilir.

Mevcut geçerli bilimsel veriler; ürünlerin klinik öncesi çalışmalarının türlerine, kapsamına ve tasarımına dayanak oluşturmaktadır. Yapılacak çalışmalardan elde edilecek verilerin yorumlanmasında da benzer şekilde bilimsel yaklaşım uygulanmalıdır.

Toksite çalışmaları, ilgili ürün ile klinik araştırmaya devam etmenin makul derecede güvenli olduğu sonucuna varılmasını sağlamak için, ürünün potansiyel toksik etkilerini tanımlamak ve karakterize etmek için yeterli olmalıdır. Ürünün potansiyel toksik etkileri, hedef organlar, doz, maruziyet yolları, maruz kalma süresi ve sıklığı ile geri dönüşümlü olma durumu açısından değerlendirilmelidir.

3.1. Primer/Sekonder Farmakodinamik Çalışmalar (Kavram Kanıt Çalışmaları)

In vivo kavram kanıt çalışmalarından önce öngörülen etkililiğın, kabul edilmiş *in vitro* testler ile gösterilmesi beklenmektedir.

Ürünün koruyucu etkisini ya da tedavi edici etkisini araştırmak için ilgili enfeksiyöz ajan ile koruyucu etkililik (*challenge*) çalışmaları yapılmalıdır. Bu tür çalışmalardan elde edilen verilerin yorumlanmasında, hayvan modelinin insanlardaki hastalığa ve bağışıklık tepkisine ne kadar benzediğı belirlenmelidir.

Kullanılacak hayvan türünün ilgili patojene duyarlı bir tür olması gerekmektedir. Seçilen hayvan türü ve modelinin uygunluğu ve seçilme sebebi gerekçelendirilmelidir. Uygun bir hayvan modelinin bulunmaması durumunda, etkililiğın kabul edilmiş *in vitro* testler ile gösterilmesi yeterlidir.

Çalışmalarda istatistiksel analiz yapılmasına yetecek sayıda hayvan kullanılması gerekmektedir.

Koruyucu etkililik (*challenge*) çalışmalarının en uygun bilimsel standartların garanti edilmesi şartıyla İLU (GLP) şartlarında yapılması zorunlu değildir.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	6 / 16

Bu çalışmalar, patojene uygun gerekli biyogüvenlik altyapısına sahip test ünitesinde yapılmalıdır.

En yüksek tolere edilebilen doz ile herhangi bir advers etkinin gözlenmediği en yüksek dozun [*No Observed Adverse Effect Level (NOAEL)*] belirlenmesi klinik araştırmada uygulanacak dozun belirlenmesi için önemlidir.

3.2. Tek Doz Toksikite Çalışmaları

Akut toksisite verisi herhangi bir çalışmadan elde edildiğinde, tek doz toksisite çalışmalarının ayrıca yapılmasına gerek bulunmamaktadır. Tercihen tekrarlı doz toksisite çalışmalarında araştırılmalıdır (örn. ilk uygulama sonrası değerlendirme yapılır).

Tek doz toksisite çalışmaları, insanlarda önerilen doz ile ilgili olarak yeterli bir güvenlik aralığı sağlayan bir dozla en az bir hayvan türü ile gerçekleştirilmelidir. Ancak bu çalışmada toksik bulgular görülür ise doz yanıt ilişkisi daha fazla karakterize edilmelidir.

Klinik olarak önerilen uygulama yolu ile uygulama yapılmalıdır.

Ürünün toksisitesine bağlı olarak, hayvanlarda morfolojik ve fizyolojik değişikliklere bağlı klinik bulguların (hematolojik, biyokimyasal ve idrar verilerinin) test süresince belirli aralıklarla izlenmesi ve kayıtlarının tutulması, test sürecinde ölen hayvanlarda otopsi sonrası histopatolojik incelemelerin yapılması gereklidir.

Hayvanların vücut ağırlıkları, su ve yem tüketimleri ölçülmelidir. Hayvanların beslenmesinde kullanılacak yemin içeriği bildirilmelidir.

Test sonrası yaşayan bütün hayvanlarda nekropsi ile fiziksel incelemeler yapılmalı, organların ağırlıkları kayıt altına alınmalı ve gerekli organ ve dokularda histopatolojik incelemeler yapılmalıdır.

Deney grubunun büyüklüğü seçilen hayvan modeline bağlıdır. Primatların kullanıldığı çalışmalarda kullanılan hayvan sayısının, kemirgen kullanılan çalışmalardan daha az olması beklenir.

Çalışmalarda istatistiksel analiz yapılmasına yetecek sayıda hayvan kullanılması gerekmektedir.

Genel olarak, kemirgenler için araştırmanın başlangıcındaki yaklaşık yaş 6-8 hafta ve tavşanlar için 3-4 aydır.

Tek doz toksisite çalışması, İLU (*GLP*) sertifikasına sahip merkezlerde yürütülmelidir.

Tekrarlı doz toksisite çalışmalarının yapıldığı durumlarda, bu çalışmalar İLU (*GLP*) koşullarında yapılacağından tek doz toksisite çalışmalarının İLU (*GLP*) koşullarında yapılması şartı aranmaz.

3.3. Tekrarlı Doz Toksikite Çalışmaları

En az birisi kemirgen olmayan iki memeli türünde gerçekleştirilmelidir. Seçilen hayvan modelinin seçilme sebebi gereçlendirilmelidir.

Acil halk sağlığı durumunda ilgili bir hayvan türünde yapılacak toksisite çalışmaları klinik araştırmaların başlatılmasını desteklemek adına yeterli olabilir. Bu durumda, insanlar üzerindeki ilk araştırmalar devam ederken eş zamanlı olarak eksik olan toksisite çalışmaları yürütülmeli ve tamamlandığında elde edilen sonuçlar derhal belgelendirilmelidir. Her durumda, daha fazla sayıda gönüllü içeren faz II ve faz III araştırmalar öncesinde eksik olan toksisite testleri tamamlanmalıdır.

Klinik olarak önerilen uygulama yolu ile uygulama yapılmalıdır.

Toksosite çalışması, en yüksek etkililik gösteren doz ile yapılmalıdır. Hangi dozun hayvan modelinde en yüksek etkililik gösterdiğini belirlemek için pilot doz-yanıt çalışmaları yapılabilir. İlgili klinik dışı çalışmalar sonucunda

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	7 / 16

toksistide kullanılacak doza karar verilmelidir. Bu çalışmalarda, klinik araştırmada kullanılması önerilen en yüksek doz değerlendirilmelidir.

Ürünün toksisitesine bağlı olarak, hayvanlarda morfolojik ve fizyolojik değişikliklere bağlı klinik bulguların (hematolojik, biyokimyasal ve idrar verilerinin) test süresince belirli aralıklarla izlenmesi ve kayıtlarının tutulması, test sürecinde ölen hayvanlarda otopsi sonrası histopatolojik incelemelerin yapılması gereklidir.

Hayvanların vücut ağırlıkları, su ve yem tüketimleri ölçülmelidir. Hayvanların beslenmesinde kullanılacak yemin içeriği bildirilmelidir.

Çalışma sonlandırıldığında tam bir *gros nekropsi* yapılmalı, makroskopik lezyonlar incelenmeli ve organ ağırlıkları kaydedilmelidir. Dokuların histopatolojik incelemeleri yapılmalıdır. Özellikle uygulama bölgesindeki ve uzağındaki lenf nodları, timus, dalak, kemik iliği ve Peyer plakları veya bronşlarla ilişkili lenfoid doku dâhil olmak üzere bağışıklık sistemi organları ile araştırma ürününün uygulama yolundan etkilenmesi beklenen organlar histopatolojik olarak dikkatle incelenmelidir. Histopatolojik incelemeler her zaman önemli organları (örn. beyin, böbrekler, karaciğer ve üreme organları) kapsamalıdır.

Deney grubunun büyüklüğü seçilen hayvan modeline bağlıdır. Primatların kullanıldığı çalışmalarda kullanılan hayvan sayısının, kemirgen kullanılan çalışmalardan daha az olması beklenir.

Çalışmalarda istatistiksel analiz yapılmasına yetecek sayıda hayvan kullanılması gerekmektedir.

Genel olarak, kemirgenler için araştırmanın başlangıcındaki yaklaşık yaş 6-8 hafta ve tavşanlar için 3-4 aydır.

Çalışma süresi, *ICH M3(R2): Guideline on Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorisation for Pharmaceuticals* kılavuzuna uygun olarak belirlenir.

Tekrarlı doz toksisite çalışması, İLU (GLP) sertifikasına sahip merkezlerde yürütülmelidir.

3.4. Güvenlilik Farmakolojisi

Güvenlilik farmakolojisinin amacı, ürünün yaşamsal işlevler üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Klinik dışı çalışmalardan ve/veya klinik araştırmalardan elde edilen veriler, ürünün fizyolojik fonksiyonları (örn. merkezi sinir sistemi, solunum, kardiyovasküler ve böbrek fonksiyonları) etkileyebileceğini düşündürüyorsa, güvenlilik farmakolojisi çalışmaları toksisite değerlendirmesine dâhil edilmelidir.

Güvenlilik farmakolojisi çalışmaları, İLU (GLP) sertifikasına sahip merkezlerde yürütülmelidir.

3.5. Farmokokinetik Çalışmalar

Bu çalışmalara gerek olup olmadığı ürün bazında değerlendirilmelidir. Farmakokinetik özellikleri tanımlanmamış ürünler için yapılmalıdır.

3.6. Lokal Tolerans Testi

Lokal toleransın değerlendirilmesi, tekrarlı doz toksisite çalışmasının bir parçası olarak veya bağımsız bir çalışma olarak yapılmalıdır.

Bu çalışmalar, İLU (GLP) sertifikasına sahip merkezlerde yürütülmelidir.

3.7. Üreme ve Gelişimsel Toksisite Çalışmaları

Rutin olarak yapılmasına gerek bulunmamakta olup tüm topluma uygulama öngörüldüğünde üreme ve gelişimsel toksisite çalışmalarının yapılması beklenmektedir.

Bu çalışmalar, İLU (GLP) sertifikasına sahip merkezlerde yürütülmelidir.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	8 / 16

3.8. Genotoksisite ve Karsinojenisite Çalışmaları

Rutin olarak yapılmasına gerek bulunmamakta olup ürünün formülasyonu ve eldeki veriler doğrultusunda beklenen etki durumunda genotoksisite ve karsinojenisite çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmalar, İLU (GLP) sertifikasına sahip merkezlerde yürütülmelidir.

4. KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURULARI

Kuruma yapılacak klinik araştırma başvuru dosyaları Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Klinik Araştırmalar Daire Başkanlığına Yapılan Klinik Araştırma Başvurularına İlişkin Kılavuz (KAD-KLVZ-02), ilgili etik kurula yapılacak klinik araştırma başvuru dosyaları ise Etik Kurullara Yapılan Klinik Araştırma Başvurularına İlişkin Kılavuz (KAD-KLVZ-03) doğrultusunda hazırlanır. Bu başvurularda klinik dışı değerlendirmenin belgelendirilmesi amacıyla iki temel doküman hazırlanmalıdır. Bu dokümanlar;

- Araştırma ürününün üretimi, kalite kontrolü, klinik dışı çalışmalarda elde edilen veriler ile klinik kullanımı hakkında bilgileri içeren Araştırma Ürünü Dosyası,
- Araştırma ürünü ile ilgili klinik dışı ve klinik verilerin özetlendiği Araştırma Broşürü³.

5. YÜRÜRLÜK

Bu Kılavuz Kurum Başkanı Onayı ile yürürlüğe girer.

6. YÜRÜTME

Bu Kılavuz hükümlerini Kurum Başkanı yürütür.

7. REFERANSLAR

- ICH M3(R2): Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals, 11 June 2009.
- ICH S7(A): Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals, 8 November 2000.
- ICH S6(R1): Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, 12 June 2011.
- EMA: Guideline on repeated dose toxicity, 01.09.2010 (CPMP/SWP/1042/99).
- EMA: Guideline on production and quality control of animal immunoglobulins and immunosera for human use, 21.07.2016 (CHMP/BWP/3354/1999 rev.1)
- WHO: Technical Report Series No. 822, 1992: Annex 1 Good Manufacturing Practices for Biological Products
- WHO: Technical Report Series, No. 413, 1969: Annex 2: Requirements for Immunosera of Animal Origin.
- WHO: Technical Report Series, No. 1004, 2017: Annex 5: Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins
- WHO: Technical Report Series, No. 463, 1970: Annex 1: Requirements for Snake Antivenins
- Avrupa Farmakopesi 01/2020:0085 numaralı monografi ile Botulinum antitoksini
- Avrupa Farmakopesi 01/2008:0086 numaralı monografi ile Difteri antitoksini

³ Araştırma broşürünün amacı; doz, doz sıklığı veya doz aralığı, uygulama yöntemleri ve güvenlilik izleme yöntemleri gibi araştırma protokolünün birçok kilit özelliğinin gerekçesinin anlaşılmasını ve bunlara uyulmasını sağlamak için sorumlu araştırmacıya ve araştırma ekibine bilgi vermektir. Araştırma ürünü dosyası ürünün tüm farmasötik gelişimine dair verileri (kalite, klinik dışı ve klinik) ihtiva ederken araştırma broşürü araştırma ekibine yönelik olarak bu gelişimin derlendiği dokümandır.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	9 / 16

- Avrupa Farmakopesi 01/2008:0090 numaralı monografi ile Gazlıgangren (karışım) antitoksini
- Avrupa Farmakopesi 01/2008:0087 numaralı monografi ile Gazlıgangren (novyi) antitoksini
- Avrupa Farmakopesi 01/2008:0088 numaralı monografi ile Gazlıgangren(perfiringens) antitoksini
- Avrupa Farmakopesi 01/2008:0089 numaralı monografi ile Gazlıgangren(septikum) antitoksini
- Avrupa Farmakopesi 01/2008:0091 numaralı monografi ile Tetanoz antitoksini
- Avrupa Farmakopesi 01/2008:0145 numaralı monografi ile Engerek venom antiserumu
- Türk Farmakopesi TFA-01/2018;90001 numaralı monografi ile Akrep venom antiserumu
- Türk Farmakopesi TFA-01/2018;90011 numaralı monografi ile Engerek venom antiserumu
- Türk Farmakopesi TFA-01/2018;90012 numaralı monografi ile Kuduz antiserumu monografıları

REVİZYON TARİHÇESİ

Revizyon No	Revizyon Tarihi	Gerekçe ve Açıklamalar
00	19.02.2021	İlk yayım tarihi
01	18.03.2024	Güncel Avrupa Farmakopesine uygun olarak Anormal Toksikite bölümü çıkarılmıştır.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	10 / 16

Ek-1: İmmünglobulin / immün serum üretiminde kullanılan hayvanlarda görülen olası virüs çeşitleri

Tablo-1: Atlarda görülen olası virüs çeşitleri
Borna virus
Equine arteritis virus
Equine encephalitis virus, Eastern and Western
Equine coronavirus
Equine foamy virus
Equine herpesvirus 1-5
Equine infectious anemia virus
Equine influenza virus
Equine morbillivirus (Hendra virus)
Japanese encephalitis virus
Equine hepacivirus
Equine pegivirus
Nipah virus
Rabies virus
Salem virus
St Louis encephalitis virus
Theiler's disease-associated virus
Tick-borne encephalitis virus
Venezuelan equine encephalitis virus
Vesicular stomatitis virus
West Nile virus
Equine encephalosis viruses
Equine rhinitis A and B viruses
Equine rotavirus

Tablo 2: Koyun ve keçilerde görülen olası virüs çeşitleri
Adenovirus
Akabane virus
Bluetongue virus
Border disease virus
Borna virus
Bovine herpesvirus types 1, 2, 4
Bovine viral diarrhoea virus
Loiping ill virus

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	11 / 16

Nairobi sheep disease
Ovine/bovine papillomavirus
Ovine herpesvirus 2
Parainfluenza virus type 3
Peste des petits ruminants (Morbillivirus)
Poxviruses (Parapox, Capripox, Cowpox)
Respiratory syncytial virus
Retroviruses (Caprine arthritis encephalitis virus, MaediVisna virus, Jaagsiekte virus, Bovine leukaemia virus)
Rift Valley fever complex
Ross river virus
Rotavirus
Tick-borne encephalitis virus
Vesicular stomatitis virus
Wesselbron virus
Epizootic haemorrhagic disease virus
Foot and mouth disease virus
Reovirus 1-3

Tablo 3: Tavşanlarda görülen olası virüs çeşitleri
Rabbit rotavirus
Reovirus type 3
Poxviruses (Rabbitpox (RPXV), Myxomatosis virus (MYXV), Shope fibroma virüs)
Rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV)
Rabbit papillomaviruses (e.g., Shope papillomavirus)
Lapine parvovirus (LPV)
Rabbit kidney vacuolating virus
Herpes cuniculi
Adenovirus
Encephalomyocarditis virus
Borna disease virus
Sendai virus
Simian Parainfluenza (SV-5)
Pneumonia virus of mouse (PVM)

Ek-2: Hayvan kaynaklı immünglobulin / immün serum bitmiş ürün testleri

Görünüş	Üründe gözle görülür bulanıklık ve partikül olmamalıdır. Kurutulmuş ürünlerde ise, önerilen miktarda sıvı ile sulandırıldığında da aynı kontrol yapılmalıdır.
Çözünürlük	Test, oda sıcaklığında, dondurularak kurutulmuş/vakum altında kurutulmuş antiserum çözücüsünün tamamının eklenmesini takiben çözünmesi esasına dayanır.
Alınabilir hacim (2.9.17)	Alınabilir hacim gereklilikleri ile uyumludur.
Kimlik testi	Kimlik testleri, biyolojik deneylerin yanı sıra fizikokimyasal ve immünolojik testleri içerebilir.
pH (2.2.3)	Sıvı veya yapılandırılmış ürünün pH değeri 6,0 – 7,0 aralığında olmalıdır.
Protein içeriği	Etikette belirtilen miktarın % 90-110 aralığında ve (yetkili otorite tarafından) aksi belirtilmedikçe en fazla 100 g/L olmalıdır. Numune 9 g/L sodyum klorür R çözeltisi ile seyreltilir ve 2 mL'de 15 mg protein içeren çözelti elde edilir. Bu çözeltinin 2 mL'si yuvarlak tabanlı santrifüj tüpüne konur, 2 mL 75 g/L'lik sodyum molibdat çözeltisi ve 1 kısım nitrojensiz sülfürik asit, 30 kısım olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanan karışımdan 2 mL eklenerek karıştırılır ve 5 dk. santrifüj edilir. Üst sıvı kısmı atılır, filtre kâğıdına tüp ters çevrilerek konulur ve tüp içerisindeki katı fazın filtreye dökülmesi sonrasında kurumaya bırakılır. Atıktaki azot miktarı sülfürik asit sindirimi yöntemi (2.5.9) ile belirlenir ve sonuç 6.25 ile çarpılarak protein miktarı hesaplanır.
Ozmolalite (2.2.35)	En az 240 mosmol/kg olmalıdır.
Yabancı proteinler	Çöktürme testi ile serum elde edilen hayvan türünün plazma proteinine karşı özel antiserum araştırıldığında sadece beyan edilen hayvanın protein parçaları mevcut olmalıdır. Yabancı protein bulunmamalıdır.
Saflık	İndirgenmeyen Poliakrilamid Jel Elektroforez (2.2.31) yöntemi, şahit numune kullanılarak gerçekleştirilir. Test numunesi ve şahit numuneye ait oluşan bantlar yoğunluk bakımından karşılaştırılır. Test edilen üründe ek bantlar bulunmamalıdır.
Moleküler boyut dağılımı	Sıvı kromatografi (2.2.29 veya 2.2.30) ile yapılır. Sonuç ürün için onaylanmış sınır aralığında olmalıdır.
Albümin	Yetkili otorite tarafından aksi belirtilmedikçe, elektroforetik olarak incelendiğinde; ürün için albümin içeriği izin verilenden fazla ya da her durumda %3'ten fazla olmamalıdır.
Sterilite testi (2.6.1)	Sterilite testleri ile uyumlu olmalıdır.
Nem (2.5.12)	Dondurularak kurutulmuş ürünlerde %3'ten fazla olmamalıdır.
Pirojenite (2.6.8)	Yetkili otorite tarafından aksi belirtilmedikçe, her bir tavşana 1 mL/kg olacak şekilde toplardamar içine enjekte edilir. Sonuç pirojenler için yapılan test ile uyumlu olmalıdır.
Potens	Hayvan immünglobulin / immün serumun biyolojik aktivitesi, biyolojik bir test ile belirlenmelidir. Potens testi, immünglobulinin fonksiyonel özelliği hakkında bilgi vermelidir. Potens testlerin çoğu, hayvanlarda immünglobulin / immün serumun koruyucu etkilerinin belirlenmesine dayanmaktadır. Örneğin, tanımlı letal bir ajan dozuna (LD ₅₀) maruz bırakılan bir grup farenin % 50'sini korumak için gerekli doz (ED ₅₀) belirlenebilir. Hayvanların kullanımından kaçınılması adına <i>in vitro</i> yöntemlerin potansiyel kullanımı araştırılmalıdır. IU/ml, mg/ml, antikor titres, nötralizan antikor titres, LD ₅₀ veya nötralize ünite /ml olarak verilebilir

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	13 / 16

Stabilite	Ürünün stabilitesi, üretici tarafından belirtilen koşullarda hızlandırılmış ve gerçek zamanlı stabilite testleri ile kanıtlanmalıdır. Acil halk sağlığı durumu söz konusu olduğunda gerçek zamanlı stabilite verisi yerine daha kısa süreyi içeren stabilite verisi kabul edilebilir. Bu durumda stabilite verisinin asgari olarak klinik araştırma süresini kapsamaya beklenmektedir. Klinik araştırma tamamlanana kadar gerçek zamanlı stabilite testlerine devam edilmelidir.
Kalıntı testleri	Kalıntı testleri (üretim prosesinde kullanılan kaprilik asit, amonyum sülfat, pepsin ve papain için) Avrupa ve Türk Farmakopelerinde belirtilen yöntemler kullanılarak yapılmalı ve test sonuçları Farmakopelerde belirtilen sınırlar içerisinde olmalıdır.
Antimikrobiyal koruyucu	Uygun bir fizikokimyasal yöntem ile antimikrobiyal koruyucu miktarı belirlenir. Miktar, etkinlik için belirtilen en düşük miktarın altında olmamalıdır. Etiketle belirtilen miktarın % 115'inden fazla olmamalıdır.
Fenol (2.5.15)	En fazla 2,5 g/L, m-krezol içeren ürünler için en fazla 3,5 g/L.
Yardımcı madde	Var ise uygun yöntemlerle konsantrasyonu belirlenmelidir.
Stabilizer	Dengeleyici (stabilizer) miktarı uygun bir fizikokimyasal yöntem ile belirlenir. Sonuç etikette belirtilen miktarın %80'ninden az ve %120'sinden fazla olmamalıdır.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-KLVZ-22	19.02.2021	18.03.2024	01	14 / 16