

Załącznik nr 3 do Zapytania ofertowego nr 01/WPD101a/2023

OPIS PRZEDMIOTU ZAMÓWIENIA

TRANSFER TECHNOLOGII, ROZWÓJ PROCESOWY ORAZ WYTWORZENIE CZĄSTECZKI

WPD101A

W STANDARDZIE NON-GMP W SKALI 4 G

SPIS TREŚCI

1. Informacje podstawowe	3
2. Uzyskanie gospodarza ekspresyjnego.....	4
2.1. Zakres prac pakietu	4
2.2. Produkt dostarczony	5
3. Szarża demonstracyjna	5
3.1. Zakres prac pakietu	5
3.2. Produkt dostarczony	5
4. Rozwój procesowy.....	6
4.1. Optymalizacja procesu upstream	6
4.2. Optymalizacja procesu midstream	6
4.3. Optymalizacja procesu downstream.....	6
4.4. Produkty dostarczone	7
5. Rozwój metod analitycznych.....	7
5.1. Produkty dostarczone	8
6. Szarża non-GMP	8
6.1. Produkty dostarczone	8

1. Informacje podstawowe

- Usługa obejmuje wykonanie transferu technologii, rozwój procesowy oraz wytworzenie białka WPD101a w standardzie non-GMP w skali 4 gramów.
- Wykonawca powinien udokumentować na potrzeby postępowania kwalifikacyjnego 2 przykłady zrealizowanego rozwoju procesowego oraz wytworzenia białka rekombinowanego z wydajnością >1 g z 1 litra fermentacji bakteryjnej oraz z czystością >98% (bez ujawniania poufnych lub wrażliwych szczegółów).
- Oferta wykonawcy powinna zawierać całkowity koszt realizacji działań objętych OPZ, w tym opracowanie procesu, produkcję, transport, przechowywanie, podatek i wszelkie inne, jeśli to konieczne. Wykonawca nie może obciążać WPD Pharmaceuticals żadnymi dodatkowymi kosztami, nieuwjętymi w ofercie.
- Firma WPD Pharmaceuticals będzie rozliczana i fakturowana etapami za każdy ukończony pakiet prac, po zaakceptowaniu jego wyników, potwierdzonym odpowiednim Protokołem Odbioru.
- Wszelkie opóźnienia, ograniczenia technologiczne i problemy ze spełnieniem kryteriów OPZ będą na bieżąco omawiane i korygowane z wykonawcą.
- Sekwencja kodująca WPD101a zostanie dostarczona przez WPD Pharmaceuticals jako wariant z kodonami dostosowanymi do ekspresji w szczepach E. coli.
- **TABELA 1** podsumowuje kluczowe parametry, które mają być wykorzystane przy projektowaniu i wdrażaniu technologii wytwarzania przez wykonawcę.
- **TABELA 2** podsumowuje podstawowe właściwości molekularne rekombinowanego białka WPD101a, które ma być wytworzone.
- **TABELA 3** zawiera ostateczną ilość WPD101a, która powinna zostać dostarczona do WPD Pharmaceuticals.
- **TABELA 4** podsumowuje zakres prac dla pakietów i czas ich trwania. Podane terminy są orientacyjne i w razie potrzeby będą na bieżąco omawiane z wykonawcą.

Tabela 1: Podstawowe wymagania technologii produkcyjnej

1.	Typ API	jednołańcuchowe fuzyjne białko rekombinowane
2.	Platforma produkcyjna	heterologiczna ekspresja w E. coli do ciałek inkluzyjnych z refoldingiem
3.	Bieżąca wydajność platformy produkcyjnej	~7 mg z 1 litra hodowli
4.	Skala docelowa produkcji	> 4 g
5.	Docelowa wydajność platformy produkcyjnej	> 1 g z 1 litra hodowli
6.	Docelowa czystość platformy produkcyjnej	> 98%
7.	Wskazanie terapeutyczne	glioblastoma
8.	Planowana droga podania	testowana w projekcie
9.	Docelowy rynek regulacyjny (EMA, FDA)	EMA / FDA
10.	Formulacja	płynna (prawdopodobnie PBS)
11.	Przechowywanie długoterminowe	-80°C

Tabela 2: Podstawowe właściwości molekularne WPD101a

1.	Forma białka	jednołańcuchowa fuzja, monomer
2.	Liczba aminokwasów	503
3.	Liczba wiązań dwusiarczkowych / reszty Cys	3 / 6
4.	MW, średnia izotopowa (Da)	54804
5.	ϵ 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$)	51715
6.	A 280nm 1%	9.44
7.	pI (teoretyczny)	5.58

Tabela 3: Ilość do dostarczenia przez wykonawcę

Material	Ilość dostarczona do WPD	Czystość RP-HPLC	Termin dostarczenia
non-GMP	>4 g	>98%	do 12 miesięcy od dnia podpisania umowy

Tabela 4: Zakres prac wykonawcy

Nr	Działanie	Material dostarczony *	Czas trwania (miesiące)
1.	Uzyskanie gospodarza ekspresyjnego	techniczny	1
2.	Szarża demonstracyjna	>1 mg	1
3.	Rozwój procesowy	techniczny	3
4.	Rozwój analityczny	techniczny	1
5.	Szarża docelowa (non-GMP)	>4 g	1
6.	Specyfikacja zwolnieniowa	non-GMP	1

* ilość do ustalenia i wykorzystania wewnątrz przez wykonawcę, jeśli nie została wskazana bezpośrednio

2. Uzyskanie gospodarza ekspresyjnego

2.1. Zakres prac pakietu

- System ekspresyjny powinien być indukowany w bakteriach z ekspresją do ciałek inkluzyjnych i etapem refoldingu. Jeśli używany jest jakikolwiek znacznik powinowactwa, powinien zostać ostatecznie usunięty.
- Sekwencja kodująca zostanie dostarczona przez WPD Pharmaceuticals jako wariant z kodonami dostosowanymi do ekspresji w szczepach E. coli.

- Sekwencja kodująca WPD101a powinna zostać zintegrowana z platformą ekspresyjną wykonawcy, prowadząc do uzyskania plazmidu(ów) ekspresyjnego(ych) i szczepu(ów) ekspresyjnego(ych).
- Optymalny gospodarz ekspresyjny powinien zostać zidentyfikowany w wyniku ekspresji na małą skalę i standardowe procedury *midstream* oraz *downstream* wykonawcy.
- Opcjonalnie, WPD Pharmaceuticals może przeprowadzić klonowanie we wskazanym plazmidzie(ach) ekspresyjnym(ach), dostarczonym przez wykonawcę, we własnym zakresie. Zostanie to omówione z wykonawcą.
- Ekspresję należy wykazać za pomocą przynajmniej nieredukującej analizy SDS-PAGE.

2.2. Produkt dostarczony

- Raport z rozwoju i uzyskania gospodarza ekspresyjnego

3. Szarża demonstracyjna

3.1. Zakres prac pakietu

- Preparat na skalę pilotażową powinien zostać wytworzony przy użyciu standardowych procedur *midstream* oraz *downstream* stosowanych przez wykonawcę w celu oczyszczania rekombinowanych białek z ciałek inkluzyjnych.
- Celem szarży jest identyfikacja problemów z rozwojem procesowym, jakością produktu i/lub rejestracją szarży przed wykonaniem właściwej szarży non-GMP.
- Do WPD Pharmaceuticals należy dostarczyć nie mniej niż 1 mg oczyszczonego białka o stężeniu nie mniejszym niż 1 mg·ml⁻¹.
- Oczyszczony preparat białkowy powinien być sporządzony w PBS, podzielony na porcje do 10 probówek i szybko zamrożony w ciekłym azocie. Ostateczna liczba porcji zostanie uzgodniona z wykonawcą w zależności od dokładnej ilości i stężenia uzyskanego materiału.
- Materiał należy dostarczyć do WPD Pharmaceutical zamrożony (np. w suchym lodzie).
- Dostarczony materiał zostanie wykorzystany do jego oceny w WPD Pharmaceuticals, m.in.: analizy jego czystości densytometrycznej (nrSDS-PAGE), wielkości hydrodynamicznej (SE-FPLC), aktywności cytotoksycznej *in vitro* (MTS) i innych, jeśli postanowiono.

3.2. Produkt dostarczony

- Raport z procesu ekspresji i oczyszczania z rejestracją szarży i certyfikatem analizy
- >1 mg oczyszczonego porcjowanego i zamrożonego preparatu WPD101a w stężeniu >1 mg·ml⁻¹

4. Rozwój procesowy

- Proces produkcyjny powinien być zoptymalizowany dla WPD101a z wykorzystaniem technologii wykonawcy.
- Zoptymalizowana wydajność oczyszczania całego procesu powinna wynosić powyżej 1 g z 1 litra fermentacji bakteryjnej.
- Końcowa czystość WPD101a nie powinna wynosić powyżej 98% według analizy RP-HPLC.

4.1. Optymalizacja procesu upstream

- Optymalizacja procesu upstream powinna obejmować:
 - nie mniej niż 3 różne szczepy gospodarza,
 - nie mniej niż 3 różne składy pożywek hodowlanych,
 - parametry fizykochemiczne fermentacji: temperatura, tlen rozpuszczony, pH, kinetyka.
- Objętość dla każdego przebiegu optymalizacji nie powinna być mniejsza niż 1 litr hodowli bakteryjnej.
- Należy zmaksymalizować wydajność zarówno wolumetryczną, jak i specyficzną ekspresji.

4.2. Optymalizacja procesu midstream

- Należy zoptymalizować następujące etapy procesu midstream:
 - ekstrakcja i oczyszczanie ciałek inkluzyjnych,
 - parametry fizykochemiczne refoldingu: stężenie białka, temperatura, kinetyka, składniki buforu, pH, potencjał redoks,
 - usuwanie znacznika w celu uzyskania pożądanego struktury pierwszorzędowej WPD101a.

4.3. Optymalizacja procesu downstream

- Oczyszczanie powinno opierać się na chromatografii ciekłowej, FPLC lub HPLC.
- Optymalizacja powinna obejmować chromatograficzne etapy wychwytywania i rozdziału. Preferencyjnie, procedura powinna zawierać również etap polerowania, w zależności od osiągniętego stopnia czystości.
- Należy przetestować co najmniej 2 różne podłoża chromatograficzne, każde z co najmniej 2 różnymi warunkami przemywania/elucji.

- Zasadniczo należy unikać ultrafiltracji i diafiltracji i nie włączać ich do procesu bez uzasadnienia.

4.4. Produkty dostarczone

- Raport z rozwoju i optymalizacji procesu z uwzględnieniem poszczególnych etapów

5. Rozwój metod analitycznych

TABELA 5 wymienia metody analityczne, które należy opracować i zastosować w celu oceny przydatności opracowanej technologii do wytwarzania WPD101a o określonych atrybutach jakościowych, przede wszystkim tożsamości i czystości. Metody te powinny być również stosowane do testów zwolnieniowych szarży końcowej, która ma być dostarczona do WPD Pharmaceuticals, a ich wyniki powinny być zawarte w certyfikacie analizy tej szarży.

Tabela 5: Kryteria specyfikacji dla WPD101a w płynnej formulacji

Test	Metoda	Kryterium akceptacji
Parametry fizykochemiczne		
Wygląd	Kontrola wizualna, Eur. Ph. 2.2.1, 2.2.2, 2.9.20 (USP 631)	TBD
pH	Eur. Ph. 2.2.3 (USP 791)	TBD
Osmolalność	Eur. Ph. 2.2.35 (USP 785)	TBD
Przewodność	Eur. Ph. 2.2.38 (USP 645)	TBD
Tożsamość		
Tożsamość	▪ CE-SDS albo SDS-PAGE, redukujący i nieredukujący	zgodność z referencją
Zawartość		
Stężenie	UV-VIS spektroskopia (A280)	>10 mg·ml ⁻¹
Czystość		
Czystość: zanieczyszczenia procesowe i białka pokrewne (agregacja, degradacja)	▪ CE-SDS albo SDS-PAGE, redukujący i nieredukujący ▪ SE-HPLC ▪ RP-HPLC	>98% (RP-HPLC)
Inne zanieczyszczenia	TBD	TBD
mikrobiologia		
Endotoksyny	Eur. Ph. 2.6.14 (USP 85)	TBD
Obciążenie biologiczne	Eur. Ph. 2.6.1 (USP 61)	TBD
CE-SDS: capillary electrophoresis - sodium dodecyl sulfate; cIEF: capillary isoelectric focusing; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Eur. Ph.: European Pharmacopoeia; IE-HPLC: ion-exchange high-performance liquid chromatography; LC: liquid chromatography; MS: mass spectrometry; qPCR:		

Tabela 5: Kryteria specyfikacji dla WPD101a w płynnej formulacji

Test	Metoda	Kryterium akceptacji
quantitative polymerase chain reaction; RP-HPLC: reverse-phase high-performance liquid chromatography; SE-HPLC: size-exclusion high-performance liquid chromatography; TBD: do ustalenia; UV-VIS: ultraviolet-visual spectroscopy		

5.1. Produkty dostarczone

- Raport z opracowania metod analitycznych wraz z protokołami

6. Szarża non-GMP

- Szarża non-GMP powinna zostać wytworzona w skali większej niż 4 g przy użyciu technologii opracowanej przez wykonawcę. Stężenie produktu końcowego powinno być większe niż 10 mg·ml⁻¹.
- Substancja lecznicza powinna być rozpuszczona w płynnym buforze (prawdopodobnie PBS). Bufor zostanie omówiony z wykonawcą. Preparat należy podzielić na porcje do 400 probówek i szybko zamrozić w ciekłym azocie. Ostateczna liczba porcji zostanie uzgodniona z wykonawcą w zależności od dokładnej ilości i stężenia uzyskanego materiału.
- Materiał non-GMP należy dostarczyć do WPD Pharmaceuticals w stanie zamrożonym, np. w suchym lodzie.
- Materiał non-GMP należy przetestować pod kątem kryteriów specyfikacji wymienionych w **TABELA 5**.
- Materiał non-GMP zostanie wykorzystany do badań toksykologicznych i przedklinicznych, wstępnych badań stabilności, wzorca referencyjnego i charakterystyki molekularnej w WPD Pharmaceuticals.

6.1. Produkty dostarczone

- Raport z procesu ekspresji i oczyszczania z rejestrem szarży i certyfikatem analizy
- >4 g oczyszczonego porcjowanego i zamrożonego preparatu WPD101a w stężeniu >10 mg·ml⁻¹