

Załącznik nr 4 do Zapytania ofertowego nr 02/WPD101A/2024

OPIS PRZEDMIOTU ZAMÓWIENIA NA

**UZYSKANIE RCB,
ROZWÓJ PROCESOWY,
ROZWÓJ ANALITYCZNY,
ROZWÓJ FORMULACYJNY,
ORAZ WYTWORZENIE CZĄSTECZKI
WPD101A
W STANDARDZIE GLP W SKALI 0.2 G**

SPIS TREŚCI

1. Informacje podstawowe	3
2. Wytworzenie RCB	5
2.1. Zakres prac pakietu	5
2.2. Produkt dostarczony	6
3. Rozwój procesowy.....	6
3.1. Zakres prac pakietu	6
3.2. Optymalizacja procesu <i>upstream</i>	6
3.3. Optymalizacja procesu <i>midstream</i>	7
3.4. Optymalizacja procesu <i>downstream</i>	7
3.5. Produkty dostarczone	7
4. Rozwój metod analitycznych.....	7
4.1. Zakres prac pakietu	7
4.2. Produkty dostarczone	9
5. Rozwój formulacyjny dla DS/DP oraz rozcieńczonego DS/DP	9
5.1. Zakres prac pakietu	9
5.2. Produkty dostarczone	10
6. Szarża produkcyjna GLP	11
6.1. Zakres prac pakietu	11
6.2. Produkty dostarczone	11
7. Analiza zwolnieniowa.....	11
7.1. Zakres prac pakietu	11
7.2. Produkty dostarczone	11

1. Informacje podstawowe

- Wytworzony materiał powinien być kwalifikowany do badań toksykokinetycznych na zwierzętach zgodnie ze standardem GLP. Wykonawca powinien dołożyć wszelkich starań, aby przewidzieć wysokość wszystkich kosztów niezbędnych do osiągnięcia celu usługi, czyli wyprodukowania WPD101a zgodnie ze standardem GLP.
- W szczególności działania wykonawcy powinny obejmować co najmniej ustanowienie RCB, rozwój procesowy, rozwój analityczny, rozwój formulacyjny oraz wytworzenie białka **WPD101a (DP)** w standardzie **GLP** w skali 0.2 grama.
- Wykonawca powinien udokumentować na potrzeby postępowania kwalifikacyjnego 2 przykłady zrealizowanego rozwoju procesowego oraz wytworzenia białka rekombinowanego **z wydajnością całkowitą procesu >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, surowce, obsługę, utylizację, podatek i wszelkie inne, jeśli to konieczne. Wykonawca nie może obciążać WPD Pharmaceuticals żadnymi dodatkowymi kosztami, nieuwjętymi w ofercie.
- WPD Pharmaceuticals może zmniejszyć ostateczny zakres wymienionych pakietów prac prowadzących do wykonania usługi i nie jest zobowiązany do zamówienia wszystkich pakietów.
- Firma WPD Pharmaceuticals będzie rozliczana i fakturowana etapami za każdy ukończony pakiet prac, po zaakceptowaniu jego materiałów i wyników, potwierdzonym odpowiednim Protokołem Odbioru. Żadna płatność z góry nie będzie akceptowana. Wszystkie pakiety robocze, ich zamawianie i fakturowane, będą traktowane odrębnie. Wszystkie powinny być fakturowane dopiero po zakończeniu prac praktycznych oraz po dostarczeniu dokumentacji i akceptacji przez WPD Pharmaceuticals.
- 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. Jeśli wymagane i uzgodnione, szczep ekspresyjny wytworzony przez WPD Pharmaceuticals może także zostać dostarczony wykonawcy.
- Materiał wyjściowy do rozpoczęcia prac nad rozwojem procesu wytwarzania, rozwojem analitycznym i rozwojem formulacyjnym może zostać dostarczony przez WPD Pharmaceuticals w celu zainicjowania i przyspieszenia prac oraz ewentualnego obniżenia całkowitych kosztów. Jeśli zajdzie taka potrzeba, zostanie to uzgodnione z wykonawcą.
- **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. Oprócz wymaganych ilości należy wyprodukować materiał w celu pokrycia potrzeb związanych z działaniami wymienionymi w **TABELA 4**.
- **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. Po dyskusjach technicznych zostanie to dostosowane do rzeczywistych wymagań i, jeśli to konieczne, rozszerzone o dodatkowe metodologie.
- Oferta powinna zawierać budżet obejmujący wszystkie działania wyszczególnione w pakietach prac, a także rozsądne szacunki kosztów:
 - przechowywanie RCB,
 - surowce,
 - materiały eksploatacyjne,
 - wyposażenie specyficzne dla procesu,
 - czynności zlecone,
 - wszelkie potencjalnie wymagane licencje.

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	0.2 g
5.	Docelowa wydajność całkowita platformy produkcyjnej	>1 g z 1 litra hodowli
6.	Docelowa czystość platformy produkcyjnej	>98%
7.	Wskazanie terapeutyczne	rak trzustki
8.	Planowana droga podania	dokrewna (IV)
9.	Docelowy rynek regulacyjny (EMA, FDA)	EMA / FDA
10.	Formulacja	płynna, buforowana
11.	Przechowywanie długoterminowe	<-60°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
GLP DP	0.2 g	>98%	12 miesięcy od dnia podpisania umowy + okres dla pakietów długoterminowych

Tabela 4: Zakres prac wykonawcy

No	Działanie	Material dostarczony*	Czas trwania (miesiące)
1.	Wytworzenie RCB	–	1
2.	Rozwój procesowy	techniczny ^{*,**}	3
3.	Rozwój analityczny	techniczny ^{*,**}	3
4.	Rozwój formułacyjny	techniczny ^{*,**}	3
5.	Szarża produkcyjna GLP	0.2 g (DP)	1
6.	Specyfikacja zwolnieniowa	szarża GLP* (DS/DP)	1

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

** materiał wyjściowy do opracowania metod analitycznych może zostać dostarczony przez WPD Pharmaceuticals w celu zainicjowania i przyspieszenia prac (w razie potrzeby zostanie uzgodniony z wykonawcą)

2. Wytworzenie RCB

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. Dostarczone zostaną również dane dotyczące sekwencji polipeptydu. Jeśli wymagane i uzgodnione, szczep ekspresyjny wytworzony przez WPD Pharmaceuticals może także zostać dostarczony wykonawcy.
- Szczep ekspresyjny wytworzony przez WPD Pharmaceuticals może zostać wykorzystany do uzyskania RCB. Alternatywnie, sekwencja kodująca WPD101a może zostać zintegrowana z platformą ekspresyjną wykonawcy, prowadząc do uzyskania plazmidu(ów) ekspresyjnego(ych) i szczepu(ów) ekspresyjnego(ych).
- Optymalne konstrukt genetyczny oraz gospodarz ekspresyjny powinien zostać zidentyfikowany w wyniku ekspresji na małą skalę i standardowe procedury *midstream* oraz *downstream* wykonawcy. Ekspresję należy wykazać za pomocą przynajmniej nieredukującej analizy SDS-PAGE.

- Tożsamość szczepu RCB należy potwierdzić poprzez genotypowanie i fenotypowanie.
- RCB należy przynajmniej przetestować pod kątem sterylności i możliwych zanieczyszczeń wirusowych lub mikrobiologicznych (np. bakteriofagów, bakterii, grzybów, mykoplazmy) metodami kompendialnymi lub alternatywnymi.
- RCB powinien być przechowywany w temperaturze $<-60^{\circ}\text{C}$ przynajmniej przez cały okres realizacji wszystkich pakietów.
- Do wytworzenia RCB nie należy używać żadnych materiałów pochodzenia ludzkiego. W przypadku użycia materiału pochodzenia zwierzęcego należy wykazać, że jest on wolny od czynników obcych.

2.2. Produkt dostarczony

- Raport z ustanowienia RCB
- RCB po zakończeniu produkcji

3. Rozwój procesowy

3.1. Zakres prac pakietu

- Proces produkcyjny dla WPD101a powinien zostać zoptymalizowany z wykorzystaniem technologii dostępnej wykonawcy.
- Zoptymalizowana wydajność oczyszczania kompletnego procesu powinna wynosić **powyżej 1 g z 1 litra fermentacji bakteryjnej**.
- Końcowa czystość WPD101a powinna wynosić **powyżej 98%** według analizy RP-HPLC.
- Należy przeprowadzić szarże potwierdzające, aby wykazać powtarzalność i spójność procesu.
- Należy unikać technik dla opracowanego procesu, które nie są skalowalne.
- Należy unikać surowców, które nie są dostępne w jakości GMP lub nie są preferowane ze względu na wysokie koszty.
- Testowanie stabilności opracowanej technologii powinno koncentrować się na krytycznych parametrach kluczowych etapów procesu.

3.2. Optymalizacja procesu *upstream*

- Optymalizacja procesu *upstream* powinna obejmować co najmniej skład pożywki hodowlanej oraz parametry fermentacji: temperatura, tlen rozpuszczony, pH, kinetyka ekspresji (optymalny czas ekspresji).
- Objętość dla każdego przebiegu optymalizacji nie powinna być mniejsza niż 1 litr hodowli bakteryjnej.

- Należy zmaksymalizować wydajność zarówno wolumetryczną, jak i specyficzną ekspresji.

3.3. Optymalizacja procesu *midstream*

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

3.4. Optymalizacja procesu *downstream*

- Oczyszczanie powinno opierać się na chromatografii cieczowej, FPLC lub HPLC.
- Optymalizacja powinna obejmować chromatograficzne etapy wychwytywania i rozdzielania. Preferencyjnie, procedura powinna zawierać również etap doczyszczania, w zależności od osiągniętego stopnia czystości.
- Należy przetestować różne podłoża chromatograficzne, każde z różnymi warunkami przemywania/elucji.
- Zasadniczo należy unikać ultrafiltracji i diafiltracji i nie włączać ich do procesu bez uzasadnienia.

3.5. Produkty dostarczone

- Raport z rozwoju i optymalizacji procesu z uwzględnieniem poszczególnych etapów
- Protokoły procesu, w tym strategia kontroli procesu dla każdego pojedynczego etapu oraz lista (prawdopodobnych) krytycznych parametrów procesu, etapy przetrzymywania i odpowiednie czasy/temperatury przetrzymywania dla półproduktów procesu oraz warunki przechowywania próbek do kontroli *in-process*

4. Rozwój metod analitycznych

4.1. Zakres prac pakietu

- Ten pakiet roboczy powinien obejmować opracowanie metod analitycznych do analizy zwolnieniowej DS/DP oraz rozcieńczonego DS/DP, jak również do analizy formulacji/stabilności czy analizy *in-process*. Zostanie to dostosowane do rzeczywistych wymagań na drodze dyskusji technicznych z wykonawcą.

- Metody opracowane przez wykonawcę powinny być preferencyjnie kwalifikowane. Zarówno metody encyklopedyczne jak i specyficzne dla produktu powinny być wystarczające do analityki *in-process*, zwolnieniowej oraz formulacji/stabilności.
- **TABELA 5** wymienia proponowane 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. Lista zostanie dostosowana do aktualnych wymagań i w razie potrzeby, po konsultacjach technicznych z wykonawcą, skrócona/rozszerzona o dodatkowe metody.

Tabela 5: Metody analityczne 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	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CE-SDS albo SDS-PAGE, redukujący i nieredukujący ▪ masa całkowita MS ▪ LC-MS/MS mapowanie peptydów, z analizą modyfikacji ▪ LC-MS/MS mostki disiarczkowe 	zgodność z referencją
Charakterystyka		
Warianty jonowe	▪ cIEF albo IE-HPLC	TBD
Struktura drugorzędowa	▪ CD albo MMS	TBD
Zawartość		
Stężenie	UV-VIS spektroskopia (A280)	(TBD) mg·ml ⁻¹
Stężenie dla rozcieńczonego DS/DP	ELISA	(TBD) µg·ml ⁻¹
Czystość		
Czystość: zanieczyszczenia procesowe i białka pokrewne (agregacja, degradacja)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CE-SDS albo SDS-PAGE, redukujący i nieredukujący ▪ SE-HPLC ▪ RP-HPLC ▪ cIEF albo IE-HPLC 	>98% (RP-HPLC)
Białka gospodarza	▪ ELISA	TBD
DNA	▪ qPCR	TBD
Inne zanieczyszczenia procesowe	TBD	TBD
Stability		

Tabela 5: Metody analityczne dla WPD101a w płynnej formulacji

Test	Metoda	Kryterium akceptacji
Podatność na agregację/denaturację	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DLS ▪ DSF ▪ MFI ▪ nephelometry 	TBD
Aktywność		
Wiązanie receptora	▪ SPR albo BLI z receptorem	TBD
Wiązanie receptora dla rozcieńzonego DS/DP	▪ ELISA z receptorem	TBD
<i>In vitro</i> test komórkowy	▪ MTS pomiar żywotności z referencyjną linią GBM	TBD
Mikrobiologia		
Endotoksyny bakteryjne	Eur. Ph. 2.6.14 (USP 85)	<10 IU·ml ⁻¹
Obciążenie biologiczne / Sterylność	Eur. Ph. 2.6.1 (USP 71)	sterylny

BLI: bilayer interferometry; CD: circular dichroism; CE-SDS: capillary electrophoresis - sodium dodecyl sulfate; cIEF: capillary isoelectric focusing; DLS: dynamic light scattering; DSF: differential scanning fluorimetry; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Eur. Ph.: European Pharmacopoeia; IE-HPLC: ion-exchange high-performance liquid chromatography; LC: liquid chromatography; MFI: micro-flow imaging; MMS: microfluidic modulation spectroscopy; MS: mass spectrometry; MTS: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; RP-HPLC: reverse-phase high-performance liquid chromatography; SE-HPLC: size-exclusion high-performance liquid chromatography; SPR: surface plasmon resonance; TBD: to be determined; UV-VIS: ultraviolet-visual spectroscopy

4.2. Produkty dostarczone

- Raport z opracowania metod analitycznych wraz z kwalifikacją
- Protokoły i szczegółowe instrukcje

5. Rozwój formulacyjny dla DS/DP oraz rozcieńzonego DS/DP

5.1. Zakres prac pakietu

- Formulacja powinna być odpowiednia do badań przedklinicznych na zwierzętach oraz do planowanych w kolejnym etapie badań klinicznych *first-in-human*. Planuje się, że WPD101a będzie podawany dożylnie (IV).
- W doświadczeniach *in vitro* na skalę laboratoryjną do preparatów WPD101a o niskim stężeniu dodaje się albuminę (HSA, BSA) jako stabilizator i środek pasywujący powierzchnię.
- Rozwój formulacyjny powinien obejmować badanie stabilności w czasie rzeczywistym, przyspieszonej stabilności i wymuszonej degradacji zgodnie ze standardami ICH w celu analizy okresu trwałości. Minimalny zestaw temperatur

powinien obejmować przechowywanie w stanie zamrożonym (-80°C, -20°C) i płynnym (2-8°C, 25°C, 40°C). Szczegóły zostaną omówione i uzgodnione z wykonawcą.

- W celu analizy podatności na agregację, rozpuszczalności oraz ścieżek degradacji testy warunków skrajnych powinny przynajmniej obejmować stabilność przyspieszoną termicznie, cykle zamrażania-rozmrażania, pH, światło, utlenianie, naprężenia mechaniczne. Dalsze szczegóły odnośnie czynników stresowych zostaną omówione z wykonawcą.
- Wybrane formułacje powinny być testowane pod kątem stabilności DS/DP w różnych warunkach przechowywania, zamierzonych oraz przyspieszonych, przez okres do kilku miesięcy w celu oszacowania okresu trwałości.
- Metody analityczne badań formułacji zostaną omówione z wykonawcą. Należy wziąć pod uwagę, że mogą być wymagane różne metody analityczne dla DS/DP i rozcieńczonego DS/DP, jeśli wymagane.
- Wybrane zostanie opakowanie podstawowe dla DS/DP. Badania formułacji powinny także obejmować ocenę kompatybilności/stabilności rozcieńczonego DS/DP w wyniku kontaktu z materiałem do podawania leku.
- Rozcieńczony DS/DP powinien być testowany w wybranych formułacjach rozcieńczony do końcowego stężenia podawania w pojemniku lub odpowiednim wyposażeniu klinicznym i pozostawać w temperaturze pokojowej do 24 godzin. Analizy powinny obejmować badanie pod kątem możliwego spadku stężenia.
- Poniżej podano **przykładowy docelowy profil DP** dla formułacji płynnej, jednak zostanie on ostatecznie omówiony i uzgodniony z wykonawcą, i odpowiednio dostosowany:
 - stężenie docelowe: 1 mg·ml⁻¹,
 - objętość: 1 ml,
 - pH: 7.0 – 8.0,
 - materiał opakowania podstawowego: standardowe fiolki szklane / standardowe PPM.
- **Rozcieńczony DP** będzie przygotowywany w aptece szpitalnej bezpośrednio przed użyciem. Ostateczne wartości parametrów zostaną omówione i uzgodnione z wykonawcą, i odpowiednio dostosowane:
 - target concentration: 10 µg·ml⁻¹,
 - pH 7.0 – 8.0,
 - stabilność: przynajmniej 24h w temperaturze pokojowej.

5.2. Produkty dostarczone

- Raport z rozwoju formułacyjnego z dokumentacją procesu opracowania formułacji, obejmująca m.in.: testy buforów, substancje pomocnicze (detergenty, cukry, poliole, aminokwasy itd.), docelowe stężenia dla formułacji końcowych, testy i metody analityczne dotyczące opracowania formułacji oraz docelowe wybrane formułacje

6. Szarża produkcyjna GLP

6.1. Zakres prac pakietu

- Szarża GLP powinna zostać wytworzona w skali **większej niż 0.2 g** przy użyciu technologii opracowanej przez wykonawcę.
- Szarża GLP (DS/DP) zostanie wykorzystana do wytworzenia materiału do przedklinicznych badań toksykokinetycznych (GLP DP), testów zwolnieniowych i do archiwizacji próbek referencyjnych.
- W celu wytworzenia DP należy przygotować DS w uprzednio opracowanej formulacji. Ostateczne stężenia zostaną uzgodnione z wykonawcą.
- Końcowym etapem części szarży GLP, skutkującym wytworzeniem GLP DP, powinna być filtracja DS i napełnienie uzgodnionych gotowych do użycia opakowań podstawowych w pomieszczeniu czystym i przechowywanie w uzgodnionych warunkach. Szczegóły zostaną omówione z wykonawcą.
- Docelowa specyfikacja GLP DS/DP, zaproponowana w **TABELA 5**, powinna być częścią instrukcji analizy.
- Materiał GLP powinien być dostarczony w stanie zamrożonym, np. w formie zamrożonej w suchym lodzie.

6.2. Produkty dostarczone

- Dokumentacja wytworzenia i kontroli jakości szarży GLP
- Certyfikaty analizy jakości z analizą zwolnieniową
- Certyfikat zgodności GLP
- 0.2 g substancji GLP DP w płynnej formulacji, podzielone na porcje do uzgodnionych pojemników do przechowywania i przechowywane w uzgodnionej temperaturze (<-20°C lub <-60°C)

7. Analiza zwolnieniowa

7.1. Zakres prac pakietu

- Ten pakiet roboczy stanowi integralną część pakietu 6. Szarża produkcyjna GLP.
- Materiał GLP należy przetestować pod kątem kryteriów specyfikacji wymienionych w **TABELA 5**. Szczegóły zostaną przedyskutowane i ustalone z wykonawcą.

7.2. Produkty dostarczone

- Raport z analizy zwolnieniowej QC
- Certyfikat analizy jakości