

## **Załącznik nr 4 do Zapytania ofertowego nr 01/WPD101A/2024**

### **OPIS PRZEDMIOTU ZAMÓWIENIA DLA PAKIETU 1**

**TRANSFER TECHNOLOGII,  
UZYSKANIE RCB,  
ROZWÓJ PROCESOWY,  
ROZWÓJ ANALITYCZNY  
ORAZ WYTWORZENIE CZĄSTECZKI  
WPD101A  
W STANDARDZIE NON-GMP W SKALI >1 G**

**SPIS TREŚCI**

1.	Informacje podstawowe .....	3
2.	Uzyskanie gospodarza ekspresyjnego.....	5
2.1.	Zakres prac pakietu .....	5
2.2.	Produkt dostarczony .....	5
3.	Rozwój procesowy.....	5
3.1.	Zakres prac pakietu .....	5
3.2.	Optymalizacja procesu <i>upstream</i> .....	6
3.3.	Optymalizacja procesu <i>midstream</i> .....	6
3.4.	Optymalizacja procesu <i>downstream</i> .....	6
3.5.	Produkty dostarczone .....	7
4.	Rozwój metod analitycznych.....	7
4.1.	Zakres prac pakietu .....	7
4.2.	Produkty dostarczone .....	8
5.	Szarża non-GMP .....	9
5.1.	Zakres prac pakietu .....	9
5.2.	Produkty dostarczone .....	9
6.	Analiza zwolnieniowa QC .....	9
6.1.	Zakres prac pakietu .....	9
6.2.	Produkty dostarczone .....	9

## 1. Informacje podstawowe

- Usługa obejmuje wykonanie transferu technologii, RCB, rozwój procesowy, rozwój analityczny oraz wytworzenie białka WPD101a w standardzie non-GMP w skali >1 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, podatek i wszelkie inne, jeśli to konieczne. Wykonawca nie może obciążać WPD Pharmaceuticals żadnymi dodatkowymi kosztami, nieuwzględnionymi w ofercie.
- 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.
- **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 wykorzystana na potrzeby Pakietu 2.
- **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.

**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	> 1 g

5.	Docelowa wydajność całkowita platformy produkcyjnej	> 1 g z 1 litra hodowli
6.	Docelowa czystość platformy produkcyjnej	> 98%
7.	Wskazanie terapeutyczne	glioblastoma
8.	Planowana droga podania	jednorazowa domózgowa infuzja CED
9.	Docelowy rynek regulacyjny (EMA, FDA)	EMA / FDA
10.	Formulacja	płynna (np. PBS)
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.	$\epsilon$ 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
Demonstracyjna szarża non-GMP	min. 1 g	min. 98%	do 12 miesięcy od dnia podpisania umowy

**Tabela 4: Zakres prac wykonawcy**

№	Działanie	Material dostarczony*	Czas trwania (miesiące)
1.	<a href="#">Uzyskanie gospodarza ekspresyjnego i wytworzenie RCB</a>	–	1
2.	<a href="#">Rozwój procesowy</a>	–	3
3.	<a href="#">Rozwój analityczny</a>	techniczny <sup>**</sup>	3
4.	<a href="#">Szarża demonstracyjna non-GMP</a>	min. 1 g dla Pakiet 2	3
5.	<a href="#">Specyfikacja zwolnieniowa</a>	szarża non-GMP*	1

\* ilość do ustalenia i wykorzystania wewnątrz 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. 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 jakkolwiek 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.
- Sekwencja kodująca WPD101a powinna zostać zintegrowana z platformą ekspresyjną wykonawcy, prowadząc do uzyskania plazmidu(ów) ekspresyjnego(ych) i szczepu(ów) ekspresyjnego(ych). Alternatywnie, jeśli zdecydowano i uzgodniono, ekspresyjny szczep wyjściowy wytworzony przez WPD Pharmaceuticals może zostać wykorzystany do uzyskania RCB.
- 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 ustanowienia RCB
- **RCB** do dalszego rozwoju powinien zostać **wytworzony** ze zidentyfikowanego wybranego szczepu wyjściowego. Do produkcji RCB nie należy używać żadnych materiałów pochodzenia ludzkiego. W przypadku użycia materiału pochodzenia zwierzęcego należy wykazać, że jest on wolny od czynników obcych.

## 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.
- Opracowany proces zostanie przeniesiony i skalowany do **fermentora <50-L** w fazie GMP projektu (Pakiet 2).

### **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 rozdziału. 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 rozcieńczony DS/DP, jak również do analizy *in-process*. Ten wymóg zostanie dostosowany do rzeczywistych wymagań na drodze dyskusjach technicznych z wykonawcą.
- Opracowane przez wykonawcę metody będą przenoszone do etapu GMP (Pakiet 2) i kwalifikowane zgodnie z **fazą kliniczną 1**. Zarówno metody encyklopedyczne jak i specyficzne dla produktu powinny być wystarczające do analityki *in-process* oraz zwolnieniowej.
- **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, a ich wyniki powinny być zawarte w certyfikacie analizy.

**Tabela 5: Kryteria specyfikacji dla WPD101a w płynnej formulacji**

Test	Metoda	Kryterium akceptacji
<b>Parametry fizykochemiczne</b>		
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
<b>Tożsamość</b>		
Tożsamość	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ CE-SDS albo SDS-PAGE, redukujący i nieredukujący</li> <li>▪ Masa całkowita MS</li> <li>▪ LC-MS/MS mapowanie peptydów</li> <li>▪ LC-MS/MS mostki disiarczkowe</li> </ul>	zgodność z referencją
Warianty jonowe	▪ cIEF or IE-HPLC	TBD
<b>Zawartość</b>		

**Tabela 5: Kryteria specyfikacji dla WPD101a w płynnej formulacji**

Test	Metoda	Kryterium akceptacji
Stężenie	UV-VIS spektroskopia (A280)	(TBD) mg·ml <sup>-1</sup>
Stężenie dla rozcieńczonego DS/DP	ELISA	(TBD) µg·ml <sup>-1</sup>
<b>Czystość</b>		
Czystość: zanieczyszczenia procesowe i białka pokrewne (agregacja, degradacja)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ CE-SDS albo SDS-PAGE, redukujący i nieredukujący</li> <li>▪ SE-HPLC</li> <li>▪ RP-HPLC</li> <li>▪ cIEF or IE-HPLC</li> </ul>	>98% (RP-HPLC)
Białka gospodarza	▪ ELISA	TBD
DNA	▪ qPCR	TBD
Inne zanieczyszczenia procesowe	TBD	TBD
<b>Potency</b>		
Wiązanie receptora	▪ SPR albo BLI z receptorem	TBD
Wiązanie receptora dla rozcieńczonego DS/DP	▪ ELISA	TBD
<i>In vitro</i> test komórkowy	▪ MTS pomiar żywotności z referencyjną linią GBM	TBD
<b>Mikrobiologia</b>		
Endotoksyny bakteryjne	Eur. Ph. 2.6.14 (USP 85)	<10 IU·ml <sup>-1</sup>
Obciążenie biologiczne / Sterylność	Eur. Ph. 2.6.1 (USP 71)	sterylny
BLI: biolayer interferometry; CD: circular dichroism; 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; 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 protokołami i szczegółowymi instrukcjami



## 5. Szarża non-GMP

### 5.1. Zakres prac pakietu

- Szarża non-GMP powinna zostać wytworzona w skali **nie mniejszej niż 1 g** przy użyciu technologii opracowanej przez wykonawcę. Stężenie produktu końcowego powinno być nie mniejsze niż  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , jednak stężenie końcowe zostanie uzgodnione z wykonawcą.
- DS powinna być rozpuszczona w płynnym buforze (np. PBS). Bufor zostanie omówiony z wykonawcą. Preparat należy podzielić na porcje, szybko zamrozić w ciekłym azocie i przechowywać w temperaturze  $<-60^{\circ}\text{C}$ , jednak temperatura zostanie uzgodniona z wykonawcą. Ostateczna liczba porcji zostanie uzgodniona z wykonawcą w zależności od dokładnej ilości i stężenia uzyskanego materiału.
- Materiał non-GMP należy dostarczyć na potrzeby Pakietu 2 w stanie zamrożonym, np. w suchym lodzie.
- Materiał non-GMP należy przetestować pod kątem kryteriów specyfikacji wymienionych w **TABELA 5**.
- Materiał non-GMP może zostać wykorzystany do rozwoju formulacyjnego, transferu metod analitycznych i jako wstępny wzorzec referencyjny w Pakiecie 2.

### 5.2. Produkty dostarczone

- Raport z procesu ekspresji i oczyszczania z rejestrem szarży i certyfikatem analizy
- Certyfikat analizy jakości
- **Min. 1 g** oczyszczonego porcjowanego i zamrożonego preparatu WPD101a w stężeniu nie mniejszym niż  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (ostatecznie stężenie i temperatura zostaną uzgodnione z wykonawcą) na potrzeby Pakietu 2

## 6. Analiza zwolnieniowa QC

### 6.1. Zakres prac pakietu

- Materiał non-GMP należy przetestować pod kątem kryteriów specyfikacji wymienionych w **TABELA 5**. Szczegóły zostaną przedyskutowane i ustalone z wykonawcą.

### 6.2. Produkty dostarczone

- Raport z analizy zwolnieniowej QC
- Certyfikat analizy jakości