

**Załącznik nr 2 do zapytania ofertowego nr 2.3**  
**QTPP i badania niekliniczne niezbędne do rejestracji produktu leczniczego Insulina M30 w**  
**EMA**

**Zakres prac wraz z przewidywanym terminem zakończenia**

Poniżej przedstawiamy zakres prac, które zostaną zlecone Oferentowi przez Zamawiającego w ramach RFQ 2.3 - QTPP i badania niekliniczne niezbędne do rejestracji produktu leczniczego Insulina M30 w EMA

Zakres prac obejmuje wykonanie docelowego profilu jakościowego produktu (QTPP), ocenę biopodobieństwa oraz badanie wymuszonej degradacji (FDS) dla formułacji Insulina M30.

W oparciu o aktualne założenia dla Projektu w ramach prowadzonych prac analizie zostaną poddane następujące próbki i numery partii:

- Referent: Humulin® M30 (10 serii produktu referencyjnego o różnej dacie ważności)
- Lek biopodobny: Gensulin® M30 (obecny produkt firmy Bioton, 10 serii dostarczonych przez Bioton)
- Lek biopodobny: Insulina M30 (3 serie walidacyjne, które zostaną wyprodukowane przez Bioton)

**Projekt składa się z następujących zadań:**

**Zadanie 0: Zarządzanie projektem**

**Zadanie 1: Zaopatrzenie i logistyka**

**Zadanie 2: Opracowanie/implementacja metody**

**Zadanie 3: Kwalifikacja/potwierdzenie metody**

**Zadanie 4: Docelowy profil produktu w zakresie jakości (QTPP)**

**Zadanie 5: Biopodobieństwo**

**Zadanie 6: Badanie degradacji wymuszonej**

**Przewidywany termin realizacji:**

| <b>Zadania</b>                                                       | <b>Przewidywany termin realizacji</b>               |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Zadanie 0: Zarządzanie projektem</b>                              | od dnia zawarcia Umowy w ramach realizacji Umowy    |
| <b>Zadanie 1: Zaopatrzenie i logistyka</b>                           | od dnia zawarcia Umowy w ramach realizacji Umowy    |
| <b>Zadanie 2: Opracowanie/implementacja metody</b>                   | od dnia zawarcia Umowy w terminie 6 miesięcy        |
| <b>Zadanie 3: Kwalifikacja/potwierdzenie metody</b>                  | od dnia zawarcia Umowy w terminie 6 miesięcy        |
| <b>Zadanie 4: Docelowy profil produktu w zakresie jakości (QTPP)</b> | od dnia zawarcia Umowy w terminie 6 miesięcy        |
| <b>Zadanie 5: Biopodobieństwo</b>                                    | od dnia zawarcia Umowy nie później niż w Q2 2026 r. |
| <b>Zadanie 6: Badanie degradacji wymuszonej</b>                      | od dnia zawarcia Umowy nie później niż w Q2 2026 r. |

**Szczegółowy zakres prac dla Zadań 1-6:****Zadanie 0: Zarządzanie projektem**

- Koordynacja działań projektowych
- Regularne spotkania i raporty z postępów

**Zadanie 1: Zaopatrzenie i logistyka**

- Pozyskanie materiałów referencyjnych (Humulin® M30)
- Odbiór, porcjowanie, przechowywanie i wysyłka próbek

**Zadanie 2: Implementacja metody**

- Opracowanie/implementacja metod analitycznych
- Korekty specyficzne dla molekuł

**Zadanie 3: Kwalifikacja/potwierdzenie metody**

- Generowanie próbek naprężeń
- Kwalifikacja i potwierdzenie metod

**Zadania 4: QTPP dla Insuliny M30**

- Charakterystyka 6 serii Humulin® M30 i 6 serii Gensulin® M30.
- Zastosowanie różnych metod analitycznych

**Zadanie 5: Biopodobieństwo Insuliny M30**

- Charakterystyka serii leków oryginalnych i biopodobnych (Humulin® M30 (4 serie), Gensulin® M30 (4 serie) i Insulina M30 (3 serie))
- Szczegółowa ocena biopodobieństwa

**Zadania 6: Badanie wymuszonej degradacji Insuliny M30**

- Generowanie i analiza próbek w warunkach stresowych
- Kompleksowy profil degradacji

**Sprawozdawczość i zapewnienie jakości**

- Oferent przygotowuje szczegółowe raporty przedstawiające metody i wyniki
- Oferent zapewni zgodność z GMP i standardami regulacyjnymi
- Oferent będzie regularnie przekazywał Zamawiającemu aktualne informacje oraz końcowe raporty podsumowujące po wykonaniu zadań 1,2,3,4,5 i 6.

**Proponowane metody analityczne do realizacji Zadań 2-6:**

| Proponowane metody                                                | Opracowanie/<br>Implementacja<br>Zadanie 2 | Kwalifikacja<br>Zadanie 3 | QTPP<br>Zadanie 4 | Biopodobieństwo<br>Zadanie 5 | Wymuszona<br>degradacja<br>Zadanie 6 |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Analiza aminokwasów                                               | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Ilościowe oznaczanie zawartości fosforanów                        | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Ilościowe oznaczanie zawartości chlorków                          | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Analiza sekwencji za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS                     | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Dalsza ocena danych: Deamidacja Asn/GLN                           | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Dalsza ocena danych: Modyfikacje N/C-Terminal                     | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Sekwencjonowanie N-końcowe Edmana: 15 aminokwasów                 | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Analiza wiązań dwusiarczkowych za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS        | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Masa cząsteczkowa według RP-HPLC-ESI-MS                           | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Profile spektroskopowe za pomocą analizy dichroizmu kołowego (CD) | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)                             | X                                          | X                         | X                 | X                            | X                                    |
| Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)                           | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Mapa peptydowa RP-HPLC-UV: EP0838                                 | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| RP-HPLC-UV: EP 0838, EP 0854                                      | X                                          | X                         | X                 | X                            | X                                    |
| Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC-HPLC)               | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF)                      | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Chromatografia wykluczania SEC-UV: EP 0854 (-MALLS)               | X                                          | X                         | X                 | X                            | X                                    |
| Test SPR IR-A                                                     | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |
| Test SPR IR-B                                                     | X                                          | X                         | X                 | X                            |                                      |

| Proponowane metody                                                         | Opracowanie/<br>Implementacja<br>Zadanie 2 | Kwalifikacja<br>Zadanie 3 | QTPP<br>Zadanie 4 | Biopodobieństwo<br>Zadanie 5 | Wymuszona<br>degradacja<br>Zadanie 6 |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Potencjometryczne oznaczanie pH: EP 2.2.32.2.3                             | X                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Osmolalność: EP 2.2.35                                                     | X                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Ilościowe oznaczanie zawartości substancji aktywnej                        | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Ilościowe oznaczanie zawartości glicerolu                                  | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Ilościowe oznaczanie zawartości sodu                                       | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Transport glukozy                                                          | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Hamowanie lipolizy                                                         | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Lipogeneza                                                                 | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Fosforylacja receptora insuliny                                            | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconymi fazami (RP-HPLC-UV-MS) | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| RP-HPLC-UV ilościowe oznaczanie m-krezolu (metoda własna Bioton)           | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| RP-HPLC (metoda własna Bioton)                                             | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Ilościowe oznaczenie zawartości fenolu                                     | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Ilościowe oznaczenie Desamido A21                                          | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Całkowite białka pokrewne: EP 0854, EP 2085                                | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |
| Mapowanie peptydów protaminy (HPLC-MS): EP 0569                            | x                                          | x                         | x                 | x                            |                                      |

### Zadanie 3: Kwalifikacja/potwierdzenie metody

Oferent opracuje główny plan kwalifikacji (QMP) obejmujący wszystkie metody i parametry kwalifikacji. Kwalifikacja jest przeprowadzana zgodnie z wydanym masterplanem kwalifikacji i instrukcją roboczą. Po kwalifikacji zostanie wygenerowany raport kwalifikacyjny (QR) dla każdej metody.

| Metoda/Parametry kwalifikacyjne                                   | Zakres           | Powtarzalność | Liniowości | Dokładność | Pośrednia precyzja | Specyficzność |
|-------------------------------------------------------------------|------------------|---------------|------------|------------|--------------------|---------------|
| Analiza aminokwasów                                               | Tożsamość        | x             | x          | x          | x                  | x             |
| Ilościowe oznaczanie zawartości fosforanów                        | Zawartość        | x             | x          | x          | x                  | x             |
| Ilościowe oznaczanie zawartości chlorków                          | Zawartość        | x             | x          | x          | x                  | x             |
| Analiza sekwencji za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS                     | Tożsamość        | x             |            |            | x                  | x             |
| Dalsza ocena danych: Deamidacja Asn/GLN                           | Tożsamość        | x             |            |            | x                  | x             |
| Dalsza ocena danych: Modyfikacje N/C-Terminal                     | Tożsamość        | x             |            |            | x                  | x             |
| Sekwencjonowanie N-końcowe Edmana: 15 aminokwasów                 | Tożsamość        |               |            |            |                    | x             |
| Analiza wiązań dwusiarczkowych za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS        | Tożsamość        | x             |            |            | x                  | x             |
| Masa cząsteczkowa według RP-HPLC-ESI-MS                           | Tożsamość        |               |            |            |                    | x             |
| Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)                             | Zanieczyszczenia | x             |            |            | x                  | x             |
| Profile spektroskopowe za pomocą analizy dichroizmu kołowego (CD) | Zanieczyszczenia | x             |            |            | x                  | x             |
| Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)                           | Charakterystyka  | x             |            |            | x                  | x             |
| Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC-HPLC)               | Zanieczyszczenia | x             | x          | x          | x                  | x             |
| Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF)                      | Zanieczyszczenia | x             | x          | x          | x                  | x             |
| RP-HPLC-UV Ilościowe oznaczanie m-krezolu (metoda własna Bioton)  | Zawartość        | x             | x          | x          | x                  | x             |

| Metoda/Parametry kwalifikacyjne                 | Zakres    | Powtarzalność | Liniowości | Dokładność | Pośrednia precyzja | Specyficzność |
|-------------------------------------------------|-----------|---------------|------------|------------|--------------------|---------------|
| Mapowanie peptydów protaminy (HPLC-MS): EP 0569 | Tożsamość | x             |            |            | x                  | x             |
| Test SPR IR-A                                   | Test      | x             |            |            | x                  | x             |
| Test SPR IR-B                                   | Test      | x             |            |            | x                  | x             |
| Ilościowe oznaczanie zawartości glicerolu, HPLC | Zawartość | x             | x          | x          | x                  | x             |
| Ilościowe oznaczanie zawartości Desamido A21    | Zawartość | x             | x          |            | x                  | x             |
| Transport glukozy                               | Test      | x             |            | x          | x                  | x             |
| Hamowanie lipolizy                              | Test      | x             |            | x          | x                  | x             |
| Lipogeneza                                      | Test      | x             |            | x          | x                  | x             |
| Fosforylacja receptora insuliny                 | Test      | x             |            | x          | x                  | x             |

#### Zadanie 4: Docelowy profil produktu w zakresie jakości (QTPP)

Celem tego zadania jest wykonanie badań QTPP na 6 seriach Humulin® M30 i 6 seriach Gensulin® M30.

| Proponowana metoda                                                | Ilość serii Humulin vs. Ilość serii Gensulin |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Analiza aminokwasów                                               | 6 na 6                                       |
| Ilościowe oznaczanie zawartości fosforanów                        | 6 na 6                                       |
| Ilościowe oznaczanie zawartości chlorku                           | 6 na 6                                       |
| Analiza sekwencji za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS                     | 6 na 6                                       |
| Dalsza ocena danych: Deamidacja Asn/GLN                           | 6 na 6                                       |
| Dalsza ocena danych: Modyfikacje N/C-Terminal                     | 6 na 6                                       |
| Sekwencjonowanie N-końcowe Edmana: 15 aminokwasów                 | 6 na 6                                       |
| Analiza wiązań dwusiarczkowych za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS        | 6 na 6                                       |
| Masa cząsteczkowa według RP-HPLC-ESI-MS                           | 6 na 6                                       |
| Profile spektroskopowe za pomocą analizy dichroizmu kołowego (CD) | 6 na 6                                       |
| Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)                             | 6 na 6                                       |
| Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)                           | 6 na 6                                       |
| Mapa peptydowa RP-HPLC-UV: EP0838                                 | 6 na 6                                       |
| RP-HPLC-UV: EP 0838, EP 0854                                      | 6 na 6                                       |
| Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC-HPLC)               | 6 na 6                                       |
| Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF)                      | 6 na 6                                       |
| Chromatografia wykluczania (SEC-UV)-MALLS                         | 6 na 6                                       |

| Proponowana metoda                                                         | Ilość serii Humulin vs. Ilość serii Gensulin |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Test SPR IR-A                                                              | 6 na 6                                       |
| Test SPR IR-B                                                              | 6 na 6                                       |
| Potencjometryczne oznaczanie pH: EP 2.2.3                                  | 6 na 6                                       |
| Osmolalność: EP 2.2.35                                                     | 6 na 6                                       |
| Ilościowe oznaczanie zawartości substancji aktywnej                        | 6 na 6                                       |
| Ilościowe oznaczanie zawartości glicerolu                                  | 6 na 6                                       |
| Ilościowe oznaczanie zawartości sodu                                       | 6 na 6                                       |
| Transport glukozy                                                          | 6 na 6                                       |
| Hamowanie lipolizy                                                         | 6 na 6                                       |
| Lipogeneza                                                                 | 6 na 6                                       |
| Fosforylacja receptora insuliny                                            | 6 na 6                                       |
| Wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconymi fazami (RP-HPLC-UV-MS) | 6 na 6                                       |
| RP-HPLC-UV Ilościowe oznaczanie m-krezolu                                  | 6 na 6                                       |

## Zadanie 5: Biopodobieństwo

Celem tego zadania jest charakterystyka Humuliny® M30 (4 serie), Gensulin® M30(4 serie) i Insuliny M30 (3 serie) w badaniu biopodobieństwa.

| Proponowana metoda                                                | Humulin M30 | Gensulin M30 | Insulina M30 |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| Analiza aminokwasów                                               | 4           | 4            | 3            |
| Ilościowe oznaczanie zawartości fosforanów                        | 4           | 4            | 3            |
| Ilościowe oznaczanie zawartości chlorku                           | 4           | 4            | 3            |
| Analiza sekwencji za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS                     | 4           | 4            | 3            |
| Dalsza ocena danych: Deamidacja Asn/GLN                           | 4           | 4            | 3            |
| Dalsza ocena danych: N/C- Modyfikacje terminala                   | 4           | 4            | 3            |
| Sekwencjonowanie N-końcowe Edmana: 15 aminokwasów                 | 4           | 4            | 3            |
| Analiza wiązań dwusiarczkowych za pomocą LC-ESI-MS i MS/MS        | 4           | 4            | 3            |
| Masa cząsteczkowa według RP-HPLC-ESI-MS                           | 4           | 4            | 3            |
| Profile spektroskopowe za pomocą analizy dichroizmu kołowego (CD) | 4           | 4            | 3            |
| Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)                             | 4           | 4            | 3            |
| Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)                           | 4           | 4            | 3            |
| Mapa peptydowa RP-HPLC-UV: EP0838                                 | 4           | 4            | 3            |
| RP-HPLC-UV: EP 0838, EP 0854                                      | 4           | 4            | 3            |
| Chromatografia oddziaływań hydrofobowych (HIC-HPLC)               | 4           | 4            | 3            |
| Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF)                      | 4           | 4            | 3            |

| Proponowana metoda                          | Humulin M30 | Gensulin M30 | Insulina M30 |
|---------------------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| Chromatografia wykluczania (SEC-UV) - MALLS | 4           | 4            | 3            |
| Test SPR IR-A                               | 4           | 4            | 3            |
| Test SPR IR-B                               | 4           | 4            | 3            |
| Potencjometryczne oznaczanie pH: EP 2.2.3   | 4           | 4            | 3            |
| Osmolalność: EP 2.2.35                      | 4           | 4            | 3            |

## Zadanie 6: Badanie degradacji wymuszonej

Celem Badania degradacji wymuszonej jest wykonanie badań porównawczych produktu referencyjnego Humuliny® M30 z seriami leków biopodobnych (Gensulin® M30 i Insuliny M30) metodą analizy wymuszonej degradacji. Próbkę zostaną poddane warunkom stresowym i zostaną przeanalizowane za pomocą metod wskazujących stabilność.

Próbki stresowe zostaną wygenerowane poprzez zastosowanie próbki produktu referencyjnego i biopodobnego (1 seria Humuliny M30, 1 seria Gensulin M30 i 1 seria Insuliny M30) do określonych czynników stresogennych. Zakłada się, że zostanie wygenerowanych do 6 punktów czasowych. Jakość wybranych próbek poddanych warunkom stresowym zostanie sprawdzona za pomocą odpowiednich metod analitycznych w celu wykrycia najbardziej odpowiedniego stanu każdego typu warunków do późniejszego porównania. Przegląd próbek warunków stresowych, które zostaną wygenerowane, znajduje się poniżej:

| Warunki stresowe | Punkty czasowe                                                                                                                     | Metoda badania                                      | Liczba próbek |              |              |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                  |                                                                                                                                    |                                                     | Humulin M30   | Gensulin M30 | Insulina M30 |
| Utlenianie       | Zostanie wygenerowanych 5 punktów czasowych (w tym "0") (np. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> w różnych temperaturach + czas trwania) | Masa całkowita białka (MS) w warunkach redukujących | 5             | 5            | 5            |
| Redukcja         | Zostanie wygenerowanych 5 punktów czasowych (w tym "0") (np. dodatek DTT w różnych temperaturach + czas trwania)                   | Masa całkowita białka (MS) w warunkach redukujących | 5             | 5            | 5            |
| Niskie pH        | Zostaną wygenerowane 4 punkty czasowe (w tym "0") (np. pH 4 w różnych temperaturach + czas trwania)                                | Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF)        | 4             | 4            | 4            |
| Wysokie pH       | Zostaną wygenerowane 4 punkty czasowe (w tym "0") (np. pH 8 w różnych temperaturach + czas trwania)                                | Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF)        | 4             | 4            | 4            |

| Warunki stresowe        | Punkty czasowe                                                                             | Metoda badania                      | Liczba próbek  |                 |                 |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                         |                                                                                            |                                     | Humulin<br>M30 | Gensulin<br>M30 | Insulina<br>M30 |
| Podwyższona temperatura | Zostanie wygenerowanych 6 punktów czasowych (w tym "0") (różne temperatury + czas trwania) | Chromatografia wykluczania (SEC-UV) | 6              | 6               | 6               |
| Wytrząsanie             | Zostaną wygenerowane 4 punkty czasowe (w tym "0") (wytrząsanie + czas trwania)             | Chromatografia wykluczania (SEC-UV) | 4              | 4               | 4               |
| Fotodegradacja          | Zostaną wygenerowane 3 punkty czasowe (w tym "0") (naświetlanie + czas trwania)            | Chromatografia wykluczania (SEC-UV) | 3              | 3               | 3               |
| Suma całkowita          |                                                                                            |                                     | 31             | 31              | 31              |