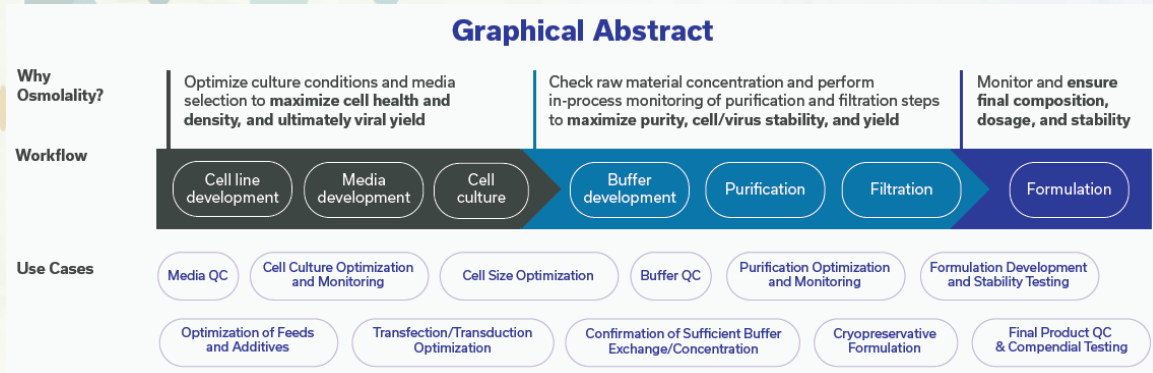


# 滲透壓測試的8種方法

## 滲透壓測試的8種方法：改善細胞基因治療的製程開發與製造



### 背景

基因和細胞療法有可能徹底改變不治之症的治療方法，這些疾病即使不是致命的，也會使人衰弱。引人注目的臨床成功和最近的藥物批准推動了對這一激動人心的治療研究領域的持續投資，截至2019年底，已有1000多種療法進入臨床試驗<sup>[1]</sup>。儘管臨床發展勢頭強勁，但要讓更多的患者群體能夠獲得這些新藥，仍需解決挑戰。目前，病毒載體生產的下游回收率低至5-30%，具體比例取決於製程<sup>[2]</sup>。製造能力、產量和供應鏈物流仍然是需要改進的重點領域，以確保客戶獲得安全且負擔得起的療法。改進和成功的關鍵是實施高質量的製程設計和製程參數，以確保耐變性 (Robustness) 和可重複性 (Reproducibility)。那麼可以使用哪些工具和檢查來確保持續的產品和過程控制？

滲透壓 (Osmolality) 是衡量溶質濃度的指標，長期以來一直被認為是生物製藥領域的關鍵指標<sup>[3,4]</sup>，用於描述給定溶液中存在多少溶質。在成份簡單或複雜的溶液中，滲透壓由於對溫度和壓力不敏感，故代表了一致且有價值的濃度，這使其成為生物製程中獨特且有益的參數。滲透壓直接影響溶質跨膜的移動<sup>[5]</sup>，使其在細胞製程和可注射產品的任何後續測試過程中都是必需的。然而，在任何生物生產工作流程中都有許多測試，細胞和基因療法的開發肯定會受益於其他令人興奮的應用。下面概述了先進治療產品的生產中滲透壓測試的八種用途。

## 什麼是滲透壓？

滲透壓是任何液體的一種特性，它描述了溶液中存在多少溶質。對於成分複雜的溶液，它反應了整體濃度，並在臨床和生物製藥領域提供了有價值的測量標準。滲透壓是作為質量函數的濃度，它對溫度和壓力不敏感，這在生物製程變化期間特別有益。生物製藥行業通常使用滲透壓力 (Osmotic pressure)——根據防止溶劑滲透到溶液中所需的壓力——來描述溶液濃度。兩者都經常用於描述溶液的濃度，因為它與滲透特性 (Osmosis) 有關。

作為生物製造的藥典放行測試，滲透壓測試在生物生產中很普遍；但是，在整個工作流程中有許多應用程序用於測試，而不僅僅是用於發布 (Releasing)。此處概述了先進治療產品生產中滲透壓測試的八種新興用途。

## 1. Media Quality Control (QC)

### 優化細胞生長/擴增和最終產量

在細胞培養過程中，必須控制細胞培養基的滲透壓以優化和維持細胞生長和載體生產。培養基供應商測量並報告其溶液產品的滲透壓範圍，而科學家通常會根據規格檢查每批培養基的滲透壓，以確保特定細胞株或細胞類型的適當環境。無論是以後用於燒瓶 (Flasks) 還是生物反應器 (Bioreactors)，培養基都必須滿足預先確定的滲透壓規格，以確保最佳的細胞生長和擴增<sup>[6]</sup>。依據文獻報導，滲透壓範圍不符合規格可能會導致 HEK293 細胞的生長速率和活細胞濃度降低，從而導致生長抑制和無效的載體生產<sup>[7]</sup>。與480 mOsm 相比，當細胞在感染時培養於330 mOsm 的滲透壓時，載體生產力提升高達10倍。GE Healthcare Life Sciences (現 Cytiva Hyclone) 的生物製程總經理 Oliver Loeillot 表示，藥品製造商傾向於購買現成的培養基，這在2017年的細胞培養領域產品價值達1.4B 美元，預計未來幾年將增長約8%<sup>[8]</sup>。這種增長意味著質量控制 (Quality Control) 比以往任何時候都更加重要。

這一明確的需求和市場趨勢表明，滲透壓是製備細胞培養基以確保細胞和基因治療早期階段的最佳生長和生產力的重要參數。

## 2. Culture Expansion and Monitoring

為細胞理想環境提供最優屬性(最優產量、規模、生長率)

滲透壓繼續作為細胞培養監測中的關鍵過程參數 (Critical Process Parameter, CPP)。細胞消耗培養基營養物和生成代謝廢物，兩者生成動態滲透壓曲線。此外，不同的餵養 (Feeding) 和補充 (Supplementation) 策略，以及使用特定氣體水平 (Gas levels) 與 pH 的控制策略，都會對滲透壓產生不同的影響<sup>[7,9]</sup>。

滲透壓是乳酸 (Lactate) 生成 (受pH影響) 和培養基鹼液添加的關鍵指標，最終影響細胞培養中的糖化 (Glycosylation)。監控此參數對於理解和優化生長和生產力至關重要。在為幹細胞建立培養條件以保持細胞活力和生產力等最佳關鍵質量屬性 (Critical Quality Attributes, CQAs) 時，許多文獻來源已經確定了滲透壓的重要性。更高的滲透壓已被用於提高代謝廢物的特定生產率和/或減緩細胞生長，以最大限度地提高生產力<sup>[10,11]</sup>。另外，在450 mOsm 的無血清培養基中，軟骨細胞 (Chondrocyte) 擴增的生產力比在400 mOsm 時低0.65倍<sup>[12]</sup>。在290至350 mOsm 的培養基中，整體細胞擴增被確定為最佳。在考慮上述策略的同時，必須為每次培養和擴展建立這個特定的滲透壓範圍。不監測滲透壓可能會影響上游製程和最終藥物產品的 CQAs。

### 3. Transfection Efficiency and Osmotic Shock

#### 建立穩定的轉染系統並獲得最佳效價

實現高轉染效率對於高病毒效價產量至關重要，但在基因治療開發中常見的狀況是轉染效率低下。無論採用何種轉染方法，當用質粒 (Plasmid) 轉染細胞以啟動病毒生產時，滲透壓都很重要。具有高度轉染力的 HEK293 細胞由於已知的有效性，通常會進行聚乙烯亞胺介導轉染 (Polyethylenimine (PEI)-mediated transfections)。許多理論認為滲透壓在內化 PEI:DNA 複合物的穩定性中起作用。PEI:DNA 複合物的原位複合速率和動力學取決於許多參數，包括滲透壓<sup>[13]</sup>。

假設複雜質子 (Protons) 進入運輸內體 (Trafficking endosomes) 引起的滲透壓增加允許將 DNA 釋放並遞送至靶細胞，這與其他變量 (Variables) 一起，必須在製程開發的早期加以考慮和表徵，以建立可靠且可重現的方法。雖然在細胞和基因治療領域沒有得到很好的發展，但有證據表明滲透壓是各種系統有效轉染的主要因素，包括免疫穿孔 (Immunoporation)<sup>[14]</sup>和電穿孔 (Electroporation)<sup>[15, 16]</sup>。滲透壓影響緩衝溶液穿過細胞膜的能力。因此，細胞培養液和轉染配置液 (Transfection Cocktails) 的滲透壓設置規範至關重要。在考慮待轉染細胞的穩定性和滲透性時，需要微妙的平衡。當目標是釋放細胞相關腺相關病毒 (AAV) 時，同樣可以在細胞裂解過程中應用。滲透休克 (Osmotic shock) 是獲取遺傳物質的一種方法，顧名思義，它在很大程度上依賴於細胞環境的滲透壓。在高鹽濃度 (高滲透壓) 下孵育可以暴露病毒基因組，但也可能會損害它們<sup>[17]</sup>。同樣，為滲透壓建立嚴格的規格範圍對於開發可控制和可重複的過程至關重要。建立這些早期上游過程控制以確保最佳效價和最終產量。

## 4. Vector Production and Stability

### 影響膜組成和結構以最大化載體穩定性

高病毒載體效價 (High viral vector titer) 高度依賴於載體穩定性，而在反轉錄病毒 (Retroviruses) 和慢病毒 (Lentiviruses) 亞群中，載體穩定性固有地受到由散佈著套膜蛋白 (Envelope Proteins) 的脂質雙層外套膜 (Outer Envelope) 的影響。

有證據支持這樣的觀點，即載體穩定性，特別是套膜載體 (Enveloped vectors)，在較高的培養基滲透壓下會提高<sup>[18]</sup>。在使用 Fly 細胞株生成 RV 載體的一系列研究中，高細胞培養基滲透壓對應於病毒膜中低膽固醇與磷脂比率 (Cholesterol-to-phospholipid ratios)，從而提高載體穩定性<sup>[19]</sup>。細胞的糖代謝極大地影響膜脂的產生。Amaral 等人發現增強的糖代謝和由此導致的培養基滲透壓增加 (由於山梨糖醇 (Sorbitol) 的存在) 與反轉錄病毒的穩定性和生產力呈正相關<sup>[18, 20]</sup>。這一證據有力地表明，穩定的反轉錄病毒在很大程度上依賴於既定的培養基滲透壓。培養基和緩衝液的滲透壓範圍應考慮到這些對載體生產和穩定性的影響，因為過程可重複性和產品產量取決於此過程控制。

## 5. Buffer QC and Purification

### 提供對下游緩衝液和製程中純化的全面控制

我們最近將滲透壓描述為下游緩衝液的正交特性 (Orthogonal property)，以及 pH 和電導率<sup>[21]</sup>。未能識別這些緩衝液中的成分問題或偏差可能會導致流程和/或產品偏差。滲透壓測試應在緩衝液品管 (Buffer QC) 期間進行，並作為純化期間的製程中參數 (In-process parameter)。這也適用於下游製程中的製程中測試 (In-process testing)。一篇2019年文獻指出，將滲透壓與 UV 吸光值相結合，描述為純化過程中蛋白質濃度的預測指標<sup>[22]</sup>。這為需要更多時間和技術專業知識的標準濃度方法提供了一種快速準確的預測測量替代方案。及早識別不純物 (Impurities) 可以節省運營成本和最終的產品產量。這在基因治療生產工作流程中如何轉化還有待觀察，但滲透壓作為下游製程中的正交參數的作用正在成為一種有價值的工具。

## 6. Concentration and Buffer Exchange

### 支持高過濾回收率和產量以實現高產品產量

細胞和基因治療中的超濾/滲濾 (Ultrafiltration, UF/Diafiltration, DF) 依賴於切向流過濾 (Tangential flow filtration, TFF) ，由於先進療法的變化無常，這已被證明在多種應用中具有優勢<sup>[2]</sup>。病毒，尤其是慢病毒 (Lentiviruses, LVs) ，比 mAbs 大得多，因此很難獲得高回收率和一致的製程表現。此外，在原料藥和藥物產品中實現高濃度的病毒載體有助於套膜 (反轉錄病毒) 和非套膜 (AAV) 病毒聚集 (Aggregation)<sup>[2]</sup>。聚集在套膜病毒中尤其容易發生，這些病毒往往具有更粘的外部。過濾操作會破壞大型套膜病毒的膜，極大地影響載體的穩定性和轉導效率 (Transduction efficiency)<sup>[23]</sup>。滲透壓在降低 AAV 聚集的可能性方面也起著至關重要的作用，並已被用於檢查防止 AAV2 載體積聚的賦形劑水平<sup>[24]</sup>。UF/DF 還用於細胞和基因治療工作流程中的緩衝液交換。滲透壓測試將有助於驗證這些交換的效率和完成度。由於一些常見緩衝液成分的特性，電導度計和 pH 計可能無法捕捉起始基質和最終配方緩衝液之間的差異。我們已經表明，滲透壓在這些情況下提供正交值<sup>[21]</sup>。滲透壓描述了溶質穿過膜的能力，因此需要在過濾過程中全面了解溶液。



## 7. Pre-formulation Processing

在進入製劑的最後過濾步驟中優化產品的效力和穩定性

滲透壓測試通常用作最終配方緩衝液的放行規範 (Release specification)，並且由於細胞和基因治療產品極其脆弱，因此需要嚴格控制。滲透壓的更多適用方式 (Indications) 也是可能的，這需要額外的研究。如上所述，由於低回收率<sup>[2]</sup>，慢病毒 (Lentiviruses, LVs) 的無菌過濾是一個已知的痛點，影響了藥物的最終過濾和配方。滲透壓可以作為最終過程和最終產品純度和安全性的可能指標，因為較高的滲透壓可能表示不需要的溶質和不純物。

這對於沒有終端無菌過濾的病毒處理特別有用<sup>[25]</sup>。此外，滲透壓力 (Osmotic pressure) 可以在病毒的流體動力學半徑中發揮作用，並幫助配方開發團隊優化截留分子量 (Molecular weight cutoff) 以進行進一步的過濾步驟。滲透作用 (osmosis) 和滲透壓力 (Osmotic pressure) 在病毒特性中的作用<sup>[26]</sup>，以及其他細胞類型的證據<sup>[27]</sup>，為該應用提供了希望。如果完成其他研究以說明滲透壓等變量通過 $0.45\ \mu\text{m}$  或 $0.22\ \mu\text{m}$  過濾器影響 LVs 的過濾性，這可能會很有趣。有明確的證據表明，預製劑藥物 (Pre-formulation drug substance) 的滲透壓會影響其過濾和回收，其表徵可以提供交付高質量藥物產品所需的控制。

## 8. Final Product Testing

### 透過優化 CQA 推廣高品質藥品

滲透壓測試一直被認為是生物藥物放行的法定測量方法 (FDA) ，因為任何進入人體的物質都必須是生理等滲 (Physiologically isotonic) 和等滲 (iso-osmotic) 的。這如何轉化為細胞療法，其中細胞是起始材料和結束材料？在具體討論細胞建庫 (Banking) 和擴增時，需要綜合測試平台來促進最佳特性 (Optimal identity)、安全性 (Safety)、純度 (Purity) 和穩定性 (Stability)<sup>[28]</sup>，滲透壓為其提供有價值信息的關鍵 CQA。這些 CQA 必須在冷凍保存 (Cryopreservation) 時得到維護和保護，冷凍細胞用於儲存藥物中間產物和產品的過程<sup>[29]</sup>。在冷凍之前，貼壁細胞必須乾淨地分離而不損壞它們。

有證據支持解離劑 (Dissociation agent) 的滲透壓影響分離細胞聚集體大小的假說<sup>[6]</sup>。冷凍/解凍循環可能不利於細胞的穩定性和恢復，因此冷凍保存劑 (如圖1中所示) 必須符合滲透壓標準，以確保細胞質量和關鍵質量屬性的保留貫穿整個生物過程。最近完成了一項研究，使用冰點降低滲透壓法 (Freezing point depression osmometry) 測試各種自製和市售冷凍防腐劑的滲透壓。

	CryoStor 55	Trehalose	Glycerol	PEG/ DMSO 1	PEG/ DMSO 2
<b>Trehalose Solution</b> Base DMEM media 10% DMSO 10% FBS 50mM trehalose					
<b>Glycerol Solution</b> Base DMEM media 10% glycerol					
<b>PEG and DMSO (1)</b> Base DMEM media 7.5% DMSO 2.5 PEG 2% BSA					
<b>PEG and DMSO (2)</b> Base DMEM media 7.5% PEG 2.5% DMSO 2% BSA					
<b>MEAN</b>	1410	2122	2083	1318	1117
<b>STD DEV</b>	4.10	4.10	5.10	1.30	1.80
<b>%CV</b>	0.29	0.20	0.25	0.10	0.16

圖1. 細胞和基因治療中常用冷凍保存劑(Cryopreservatives)的配方和滲透壓。表格顯示了使用冰點降低滲透壓計對各種低溫保存溶液進行滲透壓測試 (n=5) 的匯總數據。儘管濃度高且DMSO 整合，但滲透壓測試顯示出良好的可靠性和可重複性。CV, coefficient of variation; PEG, polyethylene glycol; DMSO, dimethyl sulfoxide.

可以理解的是，引入冷凍保護劑和冷凍細胞對其滲透壓有相當大的影響<sup>[30-32]</sup>，重複這個過程變得越來越複雜。在冷凍前測試冷凍保存物的滲透壓可確保成分正確，並為即將進行的保存步驟提供信心。

保存 (Preservation) 在治療開發的多個階段變得至關重要，從細胞庫到運輸再到臨床注射環境 (圖2)。因此，滲透壓測試應在整個工作流程的這些階段進行，以確保低溫保存特性並保護產品 CQA。

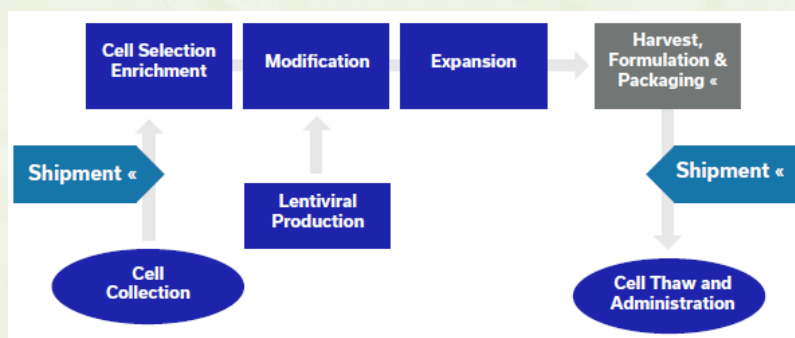


圖2. 基於細胞的基因療法的通用工作流程。冷凍保存的適用方式。

## 結論

細胞和基因療法開發的成功在很大程度上取決於其過程控制的可重複性和/或製程放大 (Scale-up) 的強度。隨著該領域的成熟，隨著對這些質量以及產品質量的期望增加，監管機構肯定會加強審查。藥物開發人員必須克服製程表現差的障礙。對穩健過程控制策略的需求不斷增加，需要可靠和準確的參數，而滲透壓測試恰好符合要求。滲透壓測試為整個生物過程中的溶液提供可靠和準確的濃度測量。此處概述了快速簡便測試的幾個應用程序，並且隨著該領域的不斷發展，預計會發現更多應用程序。過去對滲透壓和病毒載體發展的研究很重要，如此處所示，但之前並未涉及為什麼必須在每個階段測試滲透壓的故事。隨著這些主題獲得關注，人們一直對將滲透壓與關鍵 CQA 聯繫起來產生興趣。該參數支持最佳產量、純度和穩定性的能力已得到充分確立，並支持其在任何高級治療實驗室中的實施。滲透壓計技術和功能的進步將有助於持續增加生物製程中的滲透壓測試。細胞和基因療法在短時間內取得了長足的進步，人們希望找到持續改進製造工作流程的方法。滲透壓不僅提供了一種方法，還提供了八種方法來幫助您建立對生物過程的信心。

[原始文章題目：8 Ways That Osmolality Testing Improves Cell And Gene Therapy Process Development And Manufacturing](#)

## References

1. Medicine, A.f.R. ARM Annual Report & Sector Year in Review: 2019. Advancing Gene, Cell, & Tissue-Based Therapies 2020 [cited 2020 Mar 15].
2. Forsberg, N.e.a. Key Considerations in Gene Therapy Manufacturing for Commercialization. 2018.
3. Osmolality and Osmolarity. 2017, US Pharmacopeia.
4. Osmolality. European Pharmacopeia.
5. Sweeney, T.E. and C.A. Beuchat, Limitations of methods of osmometry: measuring the osmolality of biological fluids. *Am J Physiol*, 1993. 264(3 Pt 2): p. R469-80.
6. Nie, Y., et al., Scalable passaging of adherent human pluripotent stem cells. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e88012.
7. Ferreira, T.B., et al., Two different serum-free media and osmolality effect upon human 293 cell growth and adenovirus production. *Biotechnol Lett*, 2005. 27(22): p. 1809-13.
8. Stanton, D., Multi-Media Player: GE Invests in EU and US Plants to Tap \$1.4bn Market. 2018, Biopharm Intl.
9. Gilbert, A., Y. Huang, and T. Ryll, Identifying and eliminating cell culture process variability. *Pharm. Bioprocess.*, 2014. 2(6): p. 519-534.
10. Bohnenkamp, H., U. Hilbert, and T. Noll, Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale. *Cytotechnology*, 2002. 38(1-3): p. 135-45.
11. Potocar, U., et al., Adipose-Derived Stem Cells Respond to Increased Osmolarities. *PLoS One*, 2016. 11(10): p. e0163870.
12. Koo, J., et al., Controlling medium osmolality improves the expansion of human articular chondrocytes in serum-free media.
13. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. 16(5): p. 957-63. Gutierrez-Granados, S., et al., Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Crit Rev Biotechnol*, 2018. 38(6): p. 918-940.
14. Tzavelas, C., et al., Effect of osmolarity and presence of serum on the efficiency of cell transfection using immunoporation. *Anal Cell Pathol*, 2001. 22(4): p. 223-7.
15. Golzio, M., et al., Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys J*, 1998. 74(6): p. 3015-22.

16. van den Hoff, M.J., et al., The osmolarity of the electroporation medium affects the transient expression of genes. *Nucleic Acids Res*, 1990. 18(21): p. 6464.
  17. Cordova, A., et al., Osmotic shock and the strength of viral capsids. *Biophys J*, 2003. 85(1): p. 70-4.
  18. Coroadinha, A.S., et al., Effect of osmotic pressure on the production of retroviral vectors: Enhancement in vector stability. *Biotechnol Bioeng*, 2006. 94(2): p. 322-9.
  19. Rodrigues, A., P.M. Alves, and A.S. Coroadinha, Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus, in *Viral Gene Therapy*, K. Xu, Editor. 2011, Intech. p. 15-40.
  20. Amaral, A.I., et al., Improving retroviral vectors production: role of carbon sources in lipid biosynthesis. *J Biotechnol*, 2008. 138(3-4): p. 57-66.
  21. Wright, K., Osmolality as a concentration measurement method for key buffers in bioprocessing. 2019, Advanced Instruments.
  22. Felfodi, E., et al., Osmolality is a predictor for model-based real time monitoring of concentration in protein chromatography. *Journal of Chem Tech & Biotech*, 2019.
  23. Morenweiser, R., Downstream processing of viral vectors and vaccines. *Gene Ther*, 2005. 12 Suppl 1: p. S103-10.
  24. Wright, J., et al., Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Molecular Therapy*, 2005. 12(1): p. 171-178.
  25. Moleirinho, M.G., et al., Current challenges in biotherapeutic particles manufacturing. *Expert Opin Biol Ther*, 2020. 20(5): p. 451-465.
  26. Choi, H.J., et al., Effect of Osmotic Pressure on the Stability of Whole Inactivated Influenza Vaccine for Coating on Microneedles. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0134431.
  27. Rosinski, M., S. Reid, and L.K. Nielsen, Osmolarity effects on observed insect cell size after baculovirus infection are avoided using growth medium for sample dilution. *Biotechnol Prog*, 2000. 16(5): p. 782-5.
  28. Armstrong, A., Advances in Assay Technologies for CAR T-Cell Therapies. *Biopharm Intl*, 2016. 28(2): p. 32-37.
  29. Rafiq, Q., et al. The role of biopreservation in cell and gene therapy bioprocessing. *Cell & Gene Therapy Insights*, 2017. 332-344 DOI: DOI: 10.18609/cgti.2017.037.
  30. Casula, E., et al., Osmotic behaviour of human mesenchymal stem cells: Implications for cryopreservation. *PLoS One*, 2017. 12(9): p. e0184180.
  31. Li, Y. and T. Ma, Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells. *Biores Open Access*, 2012. 1(5): p. 205-14.
- Petrenko, Y., et al., Clinically Relevant Solution for the Hypothermic Storage and Transportation of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*, 2019. 2019: p. 5909524.