

## Product Information

### EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium

Chemically defined 細胞培養用培地

#### 製品説明

EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium は、Chemically defined 細胞培養用培地で、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞におけるパーフュージョン培養プロセスのために特別に設計されています。この培地は、浮遊培養中のモノクローナル抗体および組換えタンパク質の高い生産性を保ちながら、低い細胞特異的灌流速度（CSPR）で高い細胞密度に到達および維持できるように開発されました。パーフュージョン培養におけるこの培地の性能は、多様なタンパク質を産生する商業生産用 CHO 細胞系列（CHOZN® GS、CHO-S、CHO-DG44、CHO-K1）で検証されています。動物由来成分を含まない配合で、L-グルタミンは使用されていません。

#### 用途

EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium は、パーフュージョン培養用途の増幅培地および生産用培地として使用することができます。

本製品は、バイオ製造業界における研究またはその後の製造を目的としていますが、ヒトまたは治療用ではありません。

#### EX-CELL® Advanced HD Perfusion Mediumの調製法

以下の指示に従って培地の溶解を行ってください。

- 必要な最終容量の80%のMilli-Q® 水または同等の細胞培養グレードの水を室温で量ります。
- 攪拌しながら粉末培地をゆっくりと添加して、28.57 g/Lにします。30分間、攪拌を続けます。若干の濁りが残ります。



- pHを測定して、4.5未満だった場合は5N NaOHで4.5 ± 0.1に調整します。
- 1.565 g/Lの炭酸水素ナトリウムを溶液に添加します。30分間、撹拌を続けます。
- 5N NaOHでpHを9.0～9.1の間に調整し、10分間または製品が透明になるまで撹拌します。
- 5N HClでpHを7.3 ± 0.1に調整します。
- Milli-Q® 水または同等の細胞培養グレードの水を添加して、最終容量の100%とします。
- オスモル濃度を測定します。最終的なオスモル濃度が320～360 mOsmol/kgになるよう調製してください。
- 孔径0.22ミクロンのタンパク質低吸着メンブレンフィルターを使用してろ過滅菌します。
- 容量が大きい場合は、タンパク質低吸着性の0.45ミクロンのプレフィルターの使用をお奨めします。
- 製品は使用するまで2～8°Cで遮光保存します。調製したEX-CELL® Advanced HD Perfusion Mediumは30日間以上安定しています。

注：この培地にはL-グルタミンは含まれていません。必要に応じて使用前に無菌的に添加してください。

## 保存

- 乾燥粉末は、乾燥状態のまま2～8°Cで遮光保存してください。
- 有効期限を過ぎたものは使用しないでください。

## 保存期間

- 12ヶ月。

## パーフュージョンモードにおける EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium の利用

- 非 GS CHO 細胞株に使用する場合は、事前にL-グルタミンをEX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium に添加してください。推奨濃度は細胞株に応じて異なります。開始濃度は4～6 mM が推奨されます。
- 本製品を使用するために界面活性剤 (poloxamer など) を添加する必要はありません。
- シードトレイン拡大培養の際は、必要に応じて細胞選択剤を添加してください。
- 本培地は2 μM 未満のチミジンを含んでいます。必須ではありませんが、非 DHFR システムで使用する場合は事前に1 × HT サプリメントを添加することができます。

## 培地への直接馴化

細胞株をEX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium に直接馴化することができます。細胞を3～5 × 10<sup>5</sup> cells/mLで播種した後、生存率が80%以上で密度が1～2 × 10<sup>6</sup> cells/mLに到達したときに継代してください。少なくとも2～3回の継代にわたって安定した細胞倍加時間が得られ、生存率が90%以上であれば馴化は完了です。

EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium に馴化した細胞は、EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium で直接融解および培養することができます。

## 培地への連続馴化

以下に記載する馴化の手引きでは、対数増殖期の培養細胞を維持するために通常の細胞の継代を行っています。これは一般に3～4日ごとに細胞を継代することを意味します。細胞が適切に新しい培地環境へ順応するように、各馴化ステップで少なくとも2回の継代を行うことが推奨されます。

現在の培地と EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium の比率 (%)	播種密度 (× 10 <sup>5</sup> cells/mL)	細胞増殖の評価	次ステップへの許容基準
75:25	3.0	細胞密度、対数増殖期中期における生存率	正常な細胞倍加時間、最低2回の継代で生存率80%超
50:50	3.0	細胞密度、対数増殖期中期における生存率	正常な細胞倍加時間、最低2回の継代で生存率80%超
25:75	3.0	細胞密度、対数増殖期中期における生存率	正常な細胞倍加時間、最低2回の継代で生存率80%超
10:90	3.0	細胞密度、対数増殖期中期における生存率	正常な細胞倍加時間、最低2回の継代で生存率80%超
0:100	3.0	細胞密度、対数増殖期中期における生存率	少なくとも2回の継代にわたって正常な細胞倍加時間が得られ、生存率90%以上であれば馴化完了

## 継代

1. 溶解した EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium を室温に戻します。
2. フラスコから少量の細胞培養サンプルを無菌的に取り出し、血球計算盤または自動セルカウンターを使用してトリパンプレー法で計数します。生存率は常に 90% 超でなければなりません。
3.  $2 \sim 3 \times 10^5$  viable cells/mL の細胞密度から開始して目標の使用容量になるように、新しいフラスコに播種する培養細胞の正確な容量を計算します。
4. 新しいフラスコに、室温に戻した必要量の新しい培地を無菌的に添加し、計算した量の細胞を添加します。
5. 回転数 120 ~ 140 rpm のオービタルシェーカープラットフォーム（軌道直径 19 mm）で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿環境下で培養します。
6. 少なくとも週 2 回、上記のステップを繰り返して細胞を継代し、常に細胞を指数増殖期に維持します。

注：細胞を継代するときに、培地の持ち越しが最終容量の 25% を超えないようにしてください。持ち越しが 25% を超える場合は、遠心することをお奨めします。

## 凍結保存

EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium に馴化した細胞を作製することができます。

1. 必要量の細胞を調製し、生存率 90% 超の対数増殖期中期で収集します。
2. 46.5% の cold EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium、46.5% の馴化培地および 7% のジメチルスルホキシド（DMSO）からなる凍結用培地を調製します。
3. 200 xg で 5 分間遠心して細胞を収集し、慎重に上清を除去します。
4. 細胞ペレットを  $10 \sim 20 \times 10^6$  viable cells/mL で凍結培地に再懸濁します。
5. この懸濁液の 1 ~ 2 mL を滅菌済み凍結バイアルに速やかに移します。
6. 標準的な手順にしたがって、バイアルをクライオボックスまたは凍結速度制御された凍結装置に設置します（1 分に 1°C 低下）。
7. 長期保存する場合はバイアルを液体窒素に入れます（気相が推奨されます）。

## 融解

1. クリーンベンチ内またはラミナーフードの下で、50 mL 遠心管に 10 mL の培地を調製します。
  2. 37°C の温浴中で、凍結した細胞のバイアルを短時間で融解します（1 分未満）。バイアルの側面から氷の粒が離れたらバイアルを取り出します（高温で高濃度の DMSO は毒作用をもつ場合があります）。
  3. バイアルの内容物をステップ 1 の遠心管に入れ、200 × g で 5 分間遠心します。上清を除去した後、細胞を 10 mL の培地に再懸濁して 20 mL の培地が入った振とうフラスコに入れます。
- 一別の方法として、バイアルの内容物すべてを、28 ~ 29 mL の予熱した完全な EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium が入った 125 mL の振とうフラスコに無菌的に入れる方法があります。
4. 回転数 120 ~ 140 rpm のオービタルシェーカープラットフォーム（軌道直径 19 mm）で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿環境下で培養します。

## EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium のご注文情報

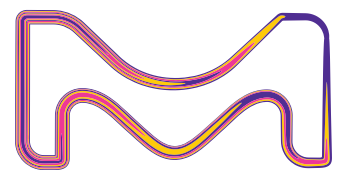
カタログ番号	製品名	パッケージサイズ	当量
24370C-5L	EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium	0.142 kg	5 L
24370C-200L	EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium	5.714 kg	200 L
24370C-500L	EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium	14.285 kg	500 L
24370C-800L	EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium	22.856 kg	800 L

## 細胞培養用添加物のご注文情報

カタログ番号	製品名	パッケージサイズ
1.37020.5000	水酸化ナトリウム（粒状）、バイオ医薬品製造用、EMPROVE® bio	5 kg
1.37013.2500	炭酸水素ナトリウム、バイオ医薬品製造用、EMPROVE® bio Ph Eur、BP、USP、JP	2.5 kg
1.00286.1000	L-グルタミン、賦形剤用、EMPROVE® exp DAB、USP	1 kg

## 無菌フィルターのご注文情報

カタログ番号	製品名	パッケージサイズ
GPWP02500	Millipore Express® PLUS メンブレン、0.22 μm、25 mm	100
GVWP02500	Durapore® メンブレン、0.22 μm、25 mm	100



Facebookもチェック 

最新の技術情報やWebinar・イベント情報を配信!

メルク プロセスソリューションズ 



本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。本紙記載の内容は 2020 年 5 月時点の情報です。  
©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

## メルク株式会社

ライフサイエンス プロセスソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら [www.merckmillipore.jp](http://www.merckmillipore.jp)

製品・技術に関するお問合せ : [PStechservice\\_JP@merckgroup.com](mailto:PStechservice_JP@merckgroup.com)

注文に関するお問合せ : [PScommercialservice\\_JP@merckgroup.com](mailto:PScommercialservice_JP@merckgroup.com)

Tel: 03-4531-1143

DS3980JA00-2005-PDF-H