

Cellvento® 4CHO-X

Expansion Medium

製品説明

シードトレインにおけるパーフュージョンの使用は、製造の柔軟性、製造力の向上、およびフットプリントの削減といった複数の利点をもたらします。

シードトレイン内のバイオリアクターの数を削減することで利便性が向上し、従来の課題が解消されます (compressed seed train)。

さらに、N-1 パーフュージョンの使用により、高播種密度培養のための、より高い細胞密度での製造バイオリアクターへの播種が可能になります。Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株に対する N-1 パーフュージョンのために特別に開発されました。低 CSPR (Cell specific perfusion rate: 細胞あたりの培地供給量) で高い細胞密度に到達できるように、高濃度の栄養素が配合されています。Cellvento 4CHO-X は Chemically defined, 動物由来成分不含、また加水分解物などの組成不明な成分を含みません。

用途

Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium は、細胞の代謝プロファイルを制御するために特別に配合されており、有毒な副生成物を最小限に抑えると同時に、高い細胞密度のための適切な栄養レベルを確保します。栄養の欠乏を防ぐことで、シードトレイン工程の堅牢性と予測可能性が向上します。本培地は、高増殖効率および高生存率に寄与し、それにより凍結保存や別のリアクターの播種のための細胞量を増加させます。パーフュージョン製造では EX-CELL® Advanced HD Perfusion Medium (24370C)、フェッドバッチ製造では Cellvento® 4CHO 培地 (103795) および Cellvento® 4Feed (103796) などと組み合わせた場合に、本培地はシードトレインの強化に対処し、IgG の製造に好影響を及ぼします。他の培地プラットフォームとも組み合わせて使用されることが想定されます。Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium は、N-1 を含むすべてのシードトレインの拡大ステップで使用することが可能で、低い CSPR で堅牢な増殖に到達します。

本製品は、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。



Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium の調製法

- 適切なサイズの容器に室温 (25°C) で必要な最終容量の 90% の Milli-Q® または同等の細胞培養グレードの水を量ります。
 - 攪拌しながら、26.2 g/L の培地をゆっくりと添加します。30 分間、攪拌を続けます。若干の濁りが残ります。
 - 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、攪拌を続けます。
 - pH を測定します。pH は 7.4 ± 0.3 であることを確認します。必要に応じて、5N HCl で pH を細胞株特有の最適値に調整します。
 - Milli-Q® 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% までメスアップします。
 - 浸透圧を確認し、310 ~ 370 mOsmol/kg であることを確認します。
 - 滅菌グレードフィルター (≤ 0.22 μm) を使用して調整後すぐろ過します。推奨されるフィルターは、3 ページを参照してください。
 - 製品は使用するまで 2 ~ 8°C で遮光保存します。
- 調製した Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium は 90 日間以上安定しています。

- サプリメントを添加した場合、液体培地は最長 4 週間安定しています。

注：本培地には L- グルタミンは含まれていません。必要に応じて、使用前または粉末を添加する際に、サプリメントを無菌的に添加してください。

- 乾燥粉末およびコンパクション培地は 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：CoA（試験成績書）に記載

拡大培養および N-1 パーフュージョンにおける Cellvento® 4CHO-X 培地の利用

非 GS CHO 細胞株に使用する場合は、事前に 4 ~ 8 mM の L- グルタミンを Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium に添加してください。

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。Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium をパーフュージョンに使用する場合は、適切な量の培地を指示に従って溶解し、適切なパーフュージョン装置を使用してバイオリアクターに培地を灌流します。灌流速度を調整するため、グルコース濃度をモニタリングすることをお奨めします。

培地へのダイレクトアダプテーション

細胞株を Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium にダイレクトアダプテーションすることができます。細胞を $3 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL で播種した後、生存率が 80% 以上で密度が $1 \sim 3 \times 10^6$ 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（20 ~ 30 時間）が得られ、VCD が 90% 以上であればアダプテーションは完了です。

培地へのシーケンシャルアダプテーション

以下に記載するアダプテーションの手引きでは、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。細胞が新しい培地環境へ適切に順応するように、各アダプテーション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。

凍結保存

細胞を 92.5% の Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium および細胞培養グレードの 7.5% ジメチルスルホキシド（DMSO）の中で凍結させて、生細胞バンクを作製することができます。

細胞凍結操作手順：

- クリーンベンチ内またはラミナーフローフードの下で、滅菌 DMSO と Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium を混合します。調製中に DMSO を希釈すると熱が放出されるため、凍結培地は事前に調製し、使用前は 2 ~ 8°C で保存してください。
- 対数増殖期中期の正常な形状の細胞を選択してください。細胞密度は 1.5×10^6 cells/mL 超、生存率は 95% 超である必要があります。
- 1200 ~ 1500 rpm で 5 分間（200 ~ 300 g）、理想的には 4°C で遠心します。
- 上清を除去し、低温（4°C）の凍結培地に $1 \sim 2 \times 10^7$ viable cells/mL で細胞を再懸濁し、細胞懸濁液を 1 mL ずつ滅菌済み凍結バイアルに入れます。
- -80°C で一晩バイアルを直接凍結し、長期保存する場合はバイアルを液体窒素タンクに移して保存します。
- 別の方法として、イソプロパノールを入れた凍結用容器を使用する以下の凍結手順があります。凍結バイアルをクライオボックスに入れて、以下の一連の手順に従って温度を下げて細胞を凍結します。
 - 4°C で 30 分間
 - -20°C で 2 ~ 4 時間
 - -80°C で一晩
 - 長期保存する場合は、バイアルを液体窒素タンクに移して保存します。

注：凍結手順は自動冷却装置を使用して標準化することができます。この場合、冷却速度を制御して、細胞懸濁液を 4°C から通常は -150°C に 1 時間で凍結します。

現在の培地と Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium の比率 (%)	播種密度 ($\times 10^5$ 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、生存率が 90% 超であればアダプテーション完了

細胞の融解および回収手順

- 細胞を融解するための 37°C のウォーターバスを準備します。
- クリーンベンチ内またはラミネアーフローフードの下で、125 mL の三角フラスコに 29 mL の Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium を用意します。
- CHO 細胞の凍結バイアルを液体窒素から 37°C のウォーターバスに移します。
- 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（高温では DMSO は毒性作用をもつ場合があります）。残った氷の大きさは米粒程度です。
- 播種密度が $3 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL になるように、CHO 細胞の懸濁液を凍結バイアルから 125 mL の三角フラスコに移し、125 mL の三角フラスコに入れて培養します。5% CO₂、湿度 80%、 1×10^6 cells/mL 以上で、37°C の CO₂ インキュベーターで細胞を培養します。以降は、Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium（単位 %）に対する標準的なプロトコールに従って細胞継代を行います。

DMSO を除去する場合：

- 細胞を融解するための 37°C のウォーターバスを準備します。
- クリーンベンチ内またはラミネアーフローフードの下で、50 mL 遠心管に 10 mL の培地を用意します
- CHO 細胞の凍結バイアルを液体窒素から 37°C の水浴に移します。
- 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（高温では DMSO は毒性作用をもつ場合があります）。残った氷の大きさは米粒程度になります。

- CHO 細胞の懸濁液を凍結バイアルから遠心管に移し、1200 ~ 1500 rpm で 5 分間遠心します
- 上清を除去し、播種密度が $3 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL になるように、細胞を新しい培地（Cellvento® 4CHO-X 培地）に再懸濁し、125 mL の三角フラスコに入れて培養します。5% CO₂、湿度 80%、 1×10^6 cells/mL 以上で、37°C の CO₂ インキュベーターで細胞を培養します。以降は、Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium（単位 %）に対する標準的なプロトコールに従って細胞継代を行います。

継代

- 溶解した Cellvento® 4CHO-X Expansion Medium を室温に戻します。
- 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ブルー法で計数します。生存率が常に 90% 超であることを確認します。
- $2 \sim 3 \times 10^5$ 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。
- 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。
- 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% CO₂、加湿環境下で培養します。
- 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、常に細胞の指数増殖を維持します。

Cellvento® 4CHO-X Expansion 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
1.03840.0001	Cellvento® 4CHO-X COMP	0.026 kg	1 L（サンプルサイズ）
1.03840.0010	Cellvento® 4CHO-X COMP	0.262 kg	10 L
1.03840.0100	Cellvento® 4CHO-X COMP	2.620 kg	100 L
1.03840.0500	Cellvento® 4CHO-X COMP	13.098 kg	500 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
1.37117.0100	ジメチルスルホキシド、EMPROVE® Expert Ph EUR、USP	100 mL

滅菌グレードフィルターのご注文情報

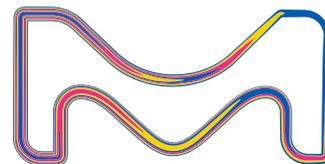
	細菌除去	マイコプラズマおよび細菌除去	ウイルス、マイコプラズマおよび細菌
容積 (L)	Millipore Express® SHC	Millipore Express® SHR、プレフィルター付	Viresolve® Barrier
1	KHGES015FF3	KHVES015FF3	VBKG005TC1
10	KHGES015FF3	KHVES015FF3	VBKG015TC1
100	KHGES003FF3	KHVES006FF3	VBKG050TC1

Cellvento® CHO 培地プラットフォームの各製品に関する詳細は、www.emdmillipore.com/cellvento をご覧ください。

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 6 月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and SAFc are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No.MK-DS5497EN. Ver 0.0 Cellvento® 4CHO-X

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

製品・技術に関するお問合せ : PStechservice_JP@merckgroup.com

注文に関するお問合せ : PScommercialservice_JP@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1143