

## Process Guidance

# Cellvento™ CHO-200 フェドバッチアプリケーション

細胞培養におけるフェドバッチプロセスの目的は2つあります。第一の目的は、生産培地により初期の細胞増殖と生産の促進をすることです。第二の目的は、フィード類を添加することで細胞の機能に必要な欠乏栄養素を補い、細胞のタンパク生産期を長く維持することです。フェドバッチプロセスでは、生産用培地とフィード類の性能は相互に依存します。そのため、どのようにフィードを行うかのフィード条件の最適化は、増殖と生産の両方が効果的に行われる培養を達成するためにとても重要です。一般的に、培地製品とフィード製品ごとにフィードする容量と頻度の推奨範囲が案内されていますが、最適なフィード条件は目的のセルラインやスケールアップするバイオプロセスに合わせて経験的に決定する必要があります。この資料はフィード条件の最適化を行うための基礎となるものですが、効果的なフィード条件の微調整をさらに考慮する必要があります。



## フェドバッチ培地システム

Cellvento™ CHO-200 培地とその関連フィード製品の Cellvento™ Feed-200 は Chemically Defined の非動物由来製品で、CHO-S 細胞ベースの動物細胞培養用です。生産培地とフィードの組み合わせは CHO-S GS 発現プラットフォームにおける高密度の細胞増殖と他社製品に引けを取らない生産性の達成に有効ですが、その他の CHO-S 細胞株への利用にも適しています。しかし、あらゆるフェドバッチプロセスの場合と同様、フィード類の添加容量と頻度の最適化が必要となります。

### 生産用培地と主要フィード

1.01885.0010	Cellvento™ CHO-200
1.01883.0001	Cellvento™ Feed-200

### その他のフィード用添加剤

1.02735.0100	L-システイン塩酸塩・一水和物 EMPROVE® exp
1.02413.0100	チロシン二ナトリウム塩・二水和物
1.02415.0400	細胞培養培地用ブドウ糖

### 生産培地用添加剤

1.37013.1000	炭酸水素ナトリウム
1.00286.1000	L-グルタミン EMPROVE® exp
F 0493	HT (50x) 添加剤

いずれの成分も個別販売可能

## アプリケーション

- Cellvento™ CHO-200 とフィードは浮遊培養中の CHO-S GS 発現系における使用を目的として考案されたものですが、その他の CHO-S 細胞株の培地としても適しています。
- Cellvento™ CHO-200 は、細胞の馴化と細胞バンク作成にご使用ください。
- Cellvento™ CHO-200 はシードトレインの増幅用（前培養）にも適しています。
- Cellvento™ 製品のフィードとフィードサプリメントの組み合わせにより、フェドバッチプロセスの最適化の柔軟性が得られます。

## フェドバッチモードでの Cellvento™ CHO-200 の利用

- すべての非 DHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) 増幅細胞株へのご使用時には、Cellvento™ CHO-200 に 100 μM ヒポキサンチンと 16 μM チミジンを添加してください。そのためには HT (50x) 添加剤を 20 mL/L 添加します。
- 非 GS CHO 細胞株へのご使用前には Cellvento™ CHO-200 に 6 mM L-グルタミンを添加してください。Cellvento™ Feed-200 は、フェドバッチ培養に使用の際には L-グルタミンの添加は不要です。
- ブドウ糖はフィーディング中に別途添加し、フェドバッチ培養中を通じて適切な濃度を維持する必要があります。
- 必要に応じて細胞選択用試薬を添加します。
- Cellvento™ Feed-200 および Cys/Tyr フィードサプリメントの至適容量と添加タイミングは、実験的に決定する必要があります。

# Cellvento™ CHO-200 培地システムの評価オプション

## 1. CHO-S 細胞の直接培地アダプテーション

細胞の中には、Cellvento™ CHO-200に直接適応可能なものも存在します。密度 $2.5 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^5$  cells/mLで播種を行い、細胞密度 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  cells/mL、および生存率が90%以上に達したら継代培養を行います。最低2回の継代の間、細胞が正常細胞分裂時間および生存率90%以上を維持すればアダプテーションは完了します。

## 2. CHO-S 細胞の逐次培地アダプテーション

Cellvento™ CHO-200 製品情報に記載されているアダプテーション（馴化）ガイドに従ってください。対数増殖能を維持するため、一般には3～4日ごとに継代を行います。細胞が新しい培地環境に確実に適応できるよう、各適応段階で最低2回の継代を行うことを推奨します。

## 3. 推奨フィード条件

Cellvento™ CHO-200 とその関連製品のフィードは互いに相補的に働き、CHO-S 細胞のタンパク質生産性を増強するよう開発されました。大半のアップストリームバイオプロセスの場合と同様に、性能を最大化するにはフィード容量と添加のタイミングをプロセスやセルラインごとに経験的に決定する必要があります。

フィード条件の検討を目的とした、各フィードの容量と頻度の推奨範囲を下表に示します。

パラメータ	推奨評価範囲
Cellvento™ Feed-200	2～6% (v/v)
ブドウ糖	2～4 g/L (1日1回測定し4 g/Lに維持)
Cys/Tyr フィード液	推奨原液の0.15～0.3% (v/v)
頻度	48～72時間フィード間隔

## 液体培地の調製

生産用培地と主要フィードの液体培地調製の際は、[www.merckmillipore.com/cellvento](http://www.merckmillipore.com/cellvento)に公開されている製品コード別の製品情報に従ってください。

## Cys/Tyr サプリメントの調製 – 1 L

成分	CAS 番号	分子量	g/L	mM
L-システイン塩酸塩	7048-06-6	175.63	52.67	299.90
L-チロシンナトリウム塩	122666-87-9	261.19	149.64	573.00

- 適切な大きさの容器に入れた Milli-Q® または同等の細胞培養グレードの水 0.1 L に、5 M NaOH を添加し pH  $\geq 13$  にします。
- 7.9 g のシステインと 22.45 g のチロシンをビーカーにゆっくり添加します。
- pH を測定し、必要に応じて 5 M 水酸化ナトリウムまたは 1 M 塩酸で  $11.3 \pm 0.1$  に調整します。
- 10 分もしくは完全に溶解するまで攪拌します。
- 細胞培養グレードの水を加えて最終容量を 0.15 L とし、最終 pH  $11.3 \pm 0.1$  を確認します。
- 溶液の浸透圧を測定します。最終浸透圧は  $3100 \pm 100$  mOsmol/kg である必要があります。
- 0.2  $\mu$ M フィルターを用いたメンブレンろ過滅菌を行います。
- 2～8°C で遮光保存します。
- このサプリメントを作成すると、システインおよびチロシンの最終濃度はそれぞれ 300 および 573 mM となります。

シェーカーフラスコ培養による初期検討ガイドンス

実験条件	操作パラメータ
培養器の種類	125 mL シェーカーフラスコ
初期培地容量	45 mL
播種密度	3x10 <sup>5</sup> cells/mL
攪拌速度	150 rpm (回転振幅 25 mm)
生産用培地	Cellvento™ CHO-200 Chemically Defined 細胞培養培地
フィード培地	Cellvento™ Feed-200 Chemically Defined 細胞培養フィード
フィード用添加剤	Cys/Tyr サプリメント
温度	37.0 ± 0.5 °C
インキュベータ pCO <sub>2</sub>	5%
培地 pH	7.0
培養終了条件	生存率 < 75% なら培養を終了
サンプリングポイント	第 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 試験日
Cellvento™ Feed-200 容量	上記参照
Cys/Tyr サプリメント	上記参照
フィーディングスケジュール	上記参照
ブドウ糖フィード添加	毎日添加、≥ 4 g/L を維持

播種後最初のサンプリングポイントは試験第 3 日、以後は毎日採取。サンプル容量は最小限 (800 µL 未満) を推奨。

サンプリングポイントの測定パラメータ

- 生細胞密度
- 生存率、ブドウ糖
- グルタミン (適宜)
- 組換えタンパク質

## フィーディング初期評価オプション

### フィーディングオプション 1

培養日	添加順序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cellvento™ Feed-200 (% v/v)	1				6		6		6		6					
ブドウ糖	2	1 日 1 回測定し 4 g/L に維持														
Cys/Tyr サプリメント (% v/v)	3*				0.15		0.3		0.3		0.3					

ブドウ糖は第 3 日以降、毎日の濃度測定結果をもとに追加添加

\* ゆっくりと培養液に添加

### フィーディングオプション 2

培養日	添加順序	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cellvento™ Feed-200 (% v/v)	1				6		6		6		6		3*			
ブドウ糖	2	1 日 1 回測定し 4 g/L に維持														
Cys/Tyr サプリメント (% v/v)	3*				0.15		0.15		0.15		0.15		0.07**			

\* ゆっくりと培養液に追加

\*\* フィード液供給は細胞の生存率が 90% 以上の場合のみ

## フェドバッチ評価の注文に関する情報

カタログ番号	製品名	包装単位	同等容量	10 Lあたりの量
1.01885.0010	Cellvento™ CHO-200	232.46 g	10 L	1 x
1.01883.0001	Cellvento™ Feed-200	115.81 g	1 L	3 x
1.02735.0100	L-システイン塩酸塩・一水和物 EMPROVE® exp	100 g	該当なし	1 x
1.02413.0100	L-チロシン二ナトリウム塩・二水和物	100 g	該当なし	1 x

## 添加物の注文に関する情報

カタログ番号	製品名	包装単位
1.02415.0400	細胞培養培地用 D (+) ブドウ糖無水物	400 g
1.00286.1000	L-グルタミン EMPROVE® exp	1,000 g
1.37012.1000	炭酸水素ナトリウム	1,000 g
F 0493	HT 添加剤 (50x) (Biochrom AG)	100 mL

本資料では、工業生産目的の発現システムを用いた細胞培養における一般的な技術情報を紹介しています。  
弊社製品に関する情報はウェブサイトをご覧ください。 [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)

お客様に提供される技術情報および法規情報の内容につきましては、弊社は可能な限り最善を尽くしておりますが、何らの義務または責任を負うものではありません。お客様はいかなる場合におきましても、現行法規を遵守されるようお願い申し上げます。第三者のあらゆる権利に関しましても同様です。弊社の提供する内容にかかわらず、お客様は弊社製品の想定される目的への適合性を自ら確認する責任を免れるものではありません。

最新の製品・技術・展示会・セミナー等の情報を毎月配信！



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あらかじめご了承ください。

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。Merck Millipore and the M mark are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

## メルク株式会社

メルクミリポア事業本部 プロセスソリューションズ事業部

〒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)

お問合せ▶ On-Line:[www.millipore.com/jpts](http://www.millipore.com/jpts) Tel:0120-013-690 Fax:03-5434-4827