Kryokonservierung von dendritischen Zellen

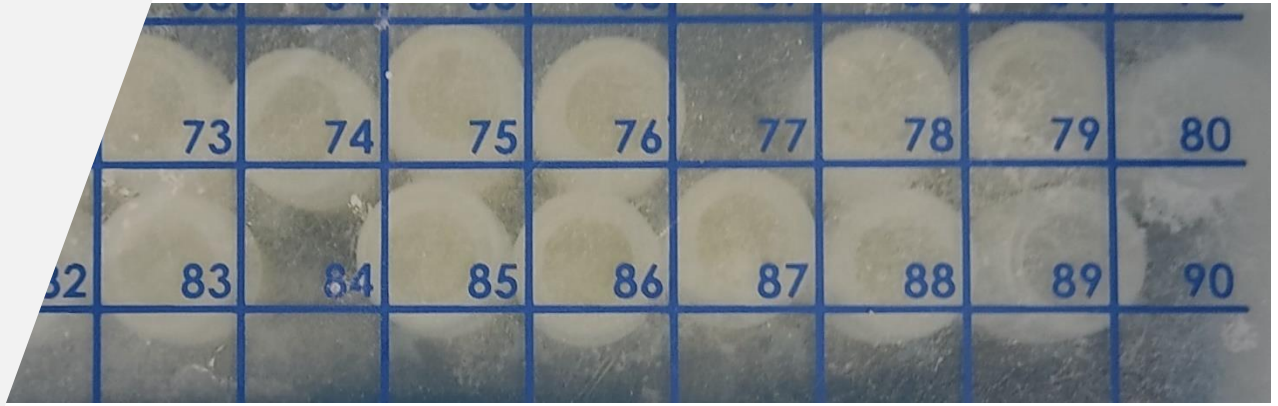
Deutsche Kälte- und Klimatagung 18.11.2022

Tarek Deeb, M.Sc

Dr.-Ing. Tim Rittinghaus

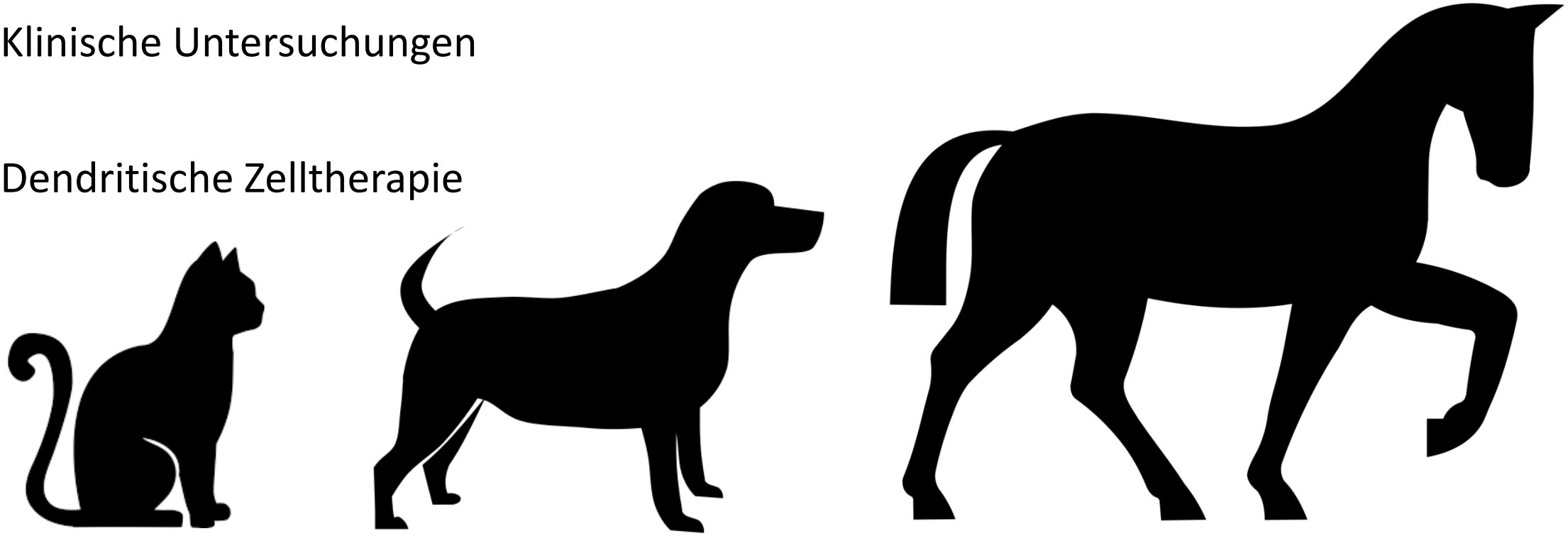
Institute for Multiphase Processes
Prof. Prof. h.c. Dr.-Ing. B. Glasmacher, M.Sc.
An der Universität 1 | Geb. 8143
30823 Garbsen

www.imp.uni-hannover.de



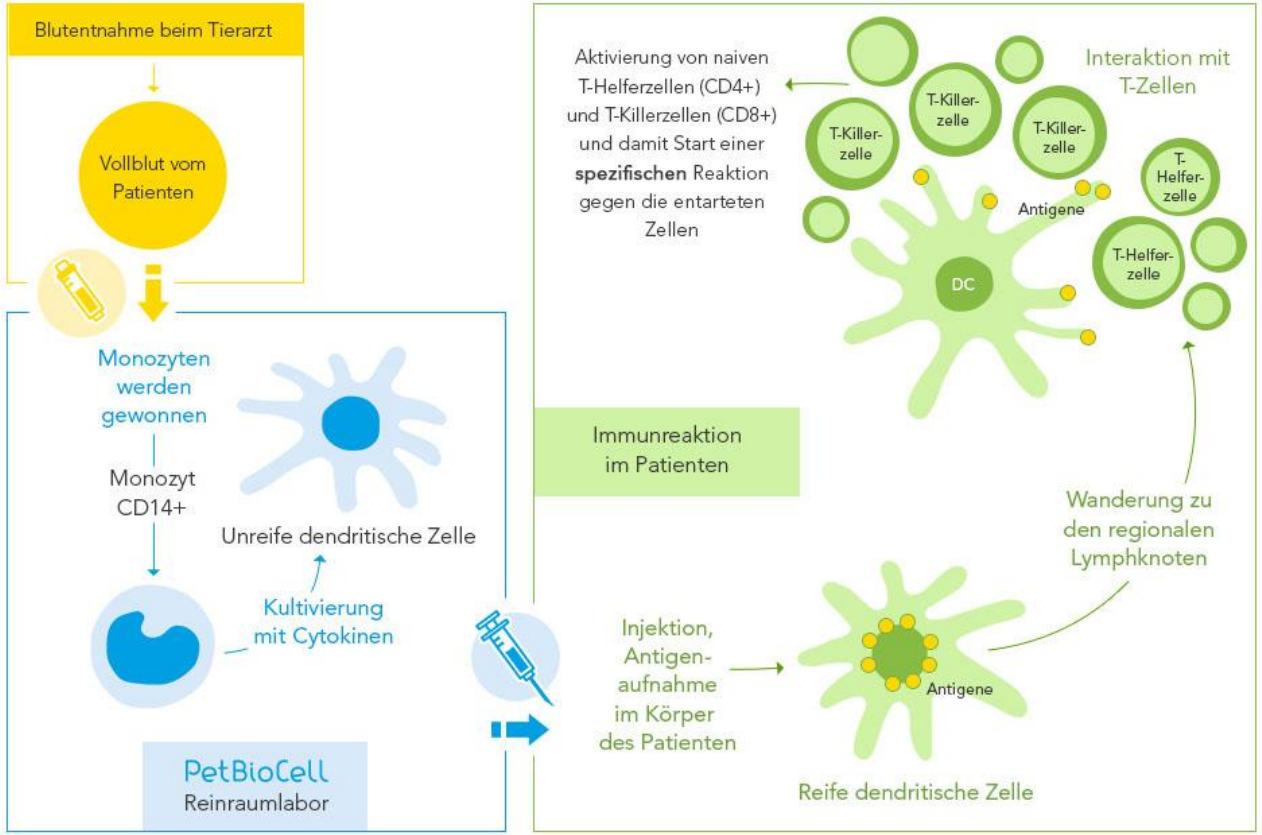
PetBioCell GmbH

- Mittelständiges Unternehmen
- Krebsbehandlung bei Haustieren
- Klinische Untersuchungen
- Dendritische Zelltherapie

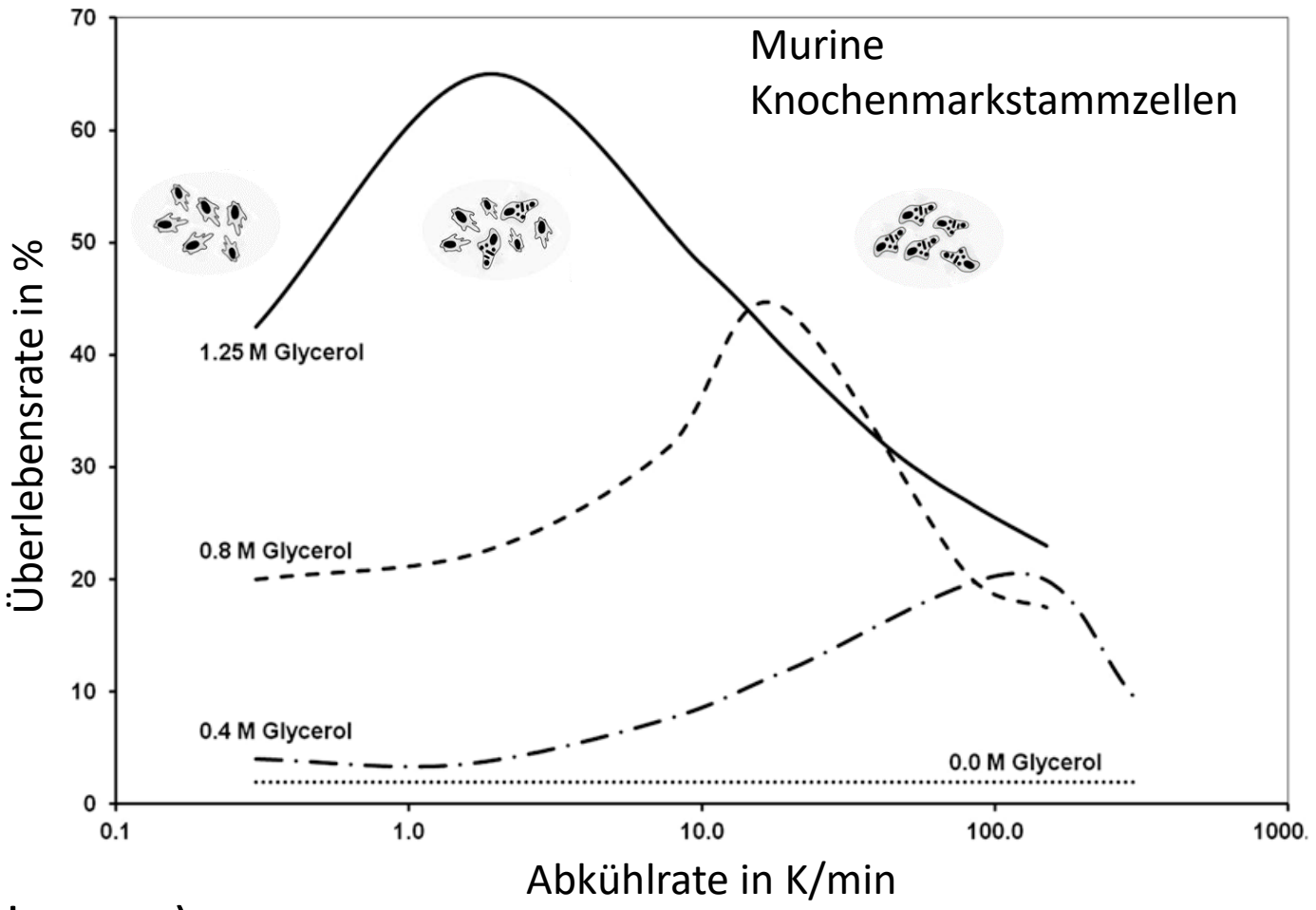


Motivation

- Die therapeutische Herangehensweise
- Eine Verstärkung des Immunsystems
- Die Problematik der Blutentnahme
- Die Kryokonservierung und die Zusammenarbeit mit IMP



- 2-Faktor-Hypothese von Mazur
  - Lösungsschädigung
  - Eisschädigung
- Kryoprotektiva
  - Permeierend (DMSO, Glycerol)
  - Nicht Permeierend (Trehalose, Saccharose)



HUNT, Charles J. (2017)

Stand der Technik | Kryokonservierung

Einfrieren

PCD

CRF

Lagern

LN2 Tank

Auftauen

Wasserbad

Methoden und Material | Protokoll

Konzentration	1 / 5 $\times 10^6$/ml
CPA	10% DMSO + 90% autologes Serum
Abkühlrate	-1 K/min bis -80°C
Lagerung	in LN2-Tank bei -196°C
Lagerungszeit	4 / 8 / 12 Wochen
Auftauen	Wasserbad 37°C
Verdünnungsmedium (VM)	PBS/NaCl 0,9%
Verdünnungsfaktor (Waschen)	5-10 / 1 (VM/Probe)

Quantitative Bewertung

Vi-Cell™XR Cell Analyzer

Automatische Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

NIFE

Qualitative Bewertung

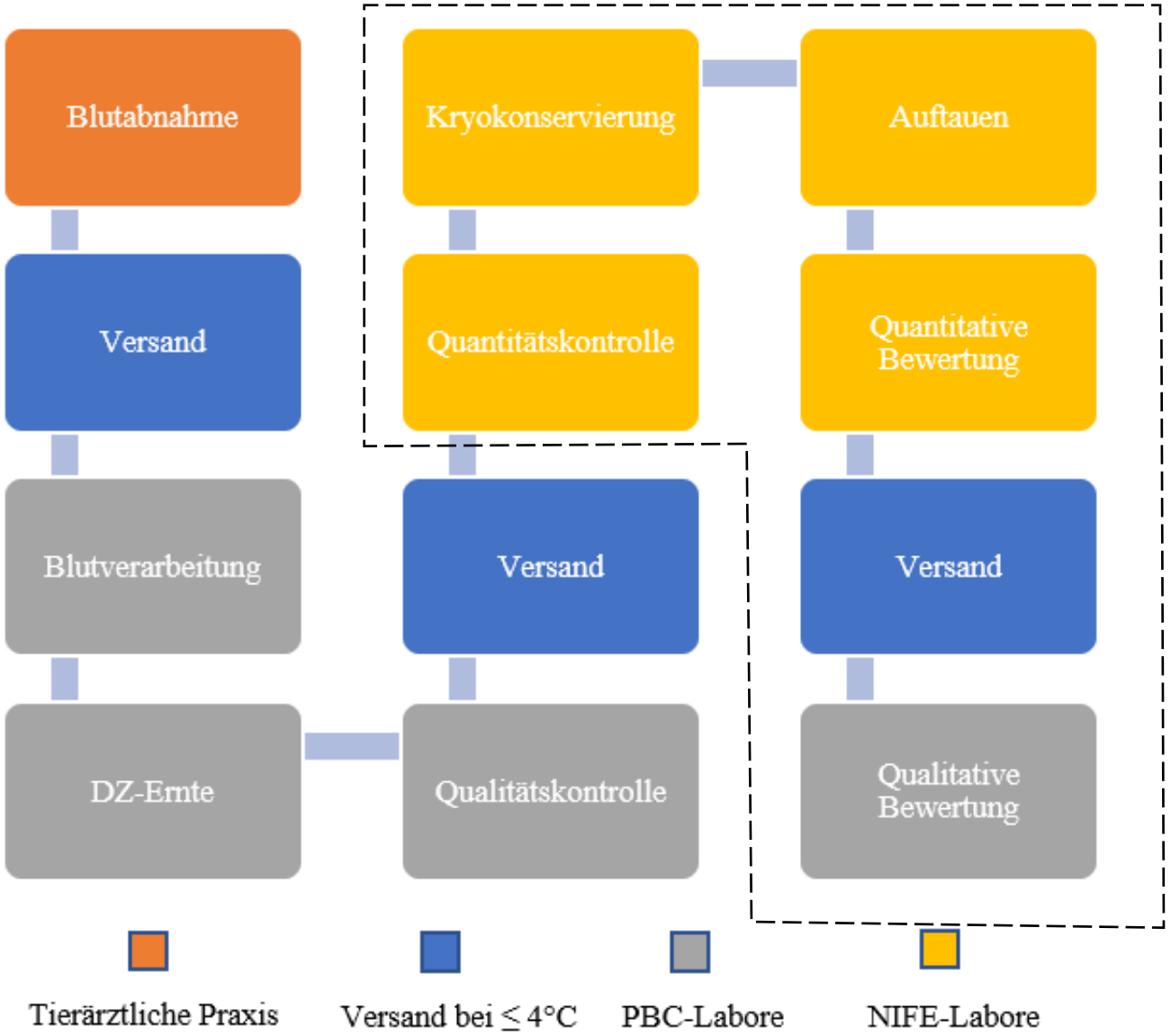
CyFlow Cube6, Sysmex

Fluoreszenz- markierte Zellsortierung (FACS)

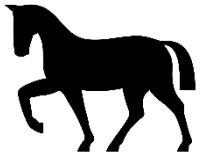
MHC II (Pferd) oder CD1b (Hund)

PBC

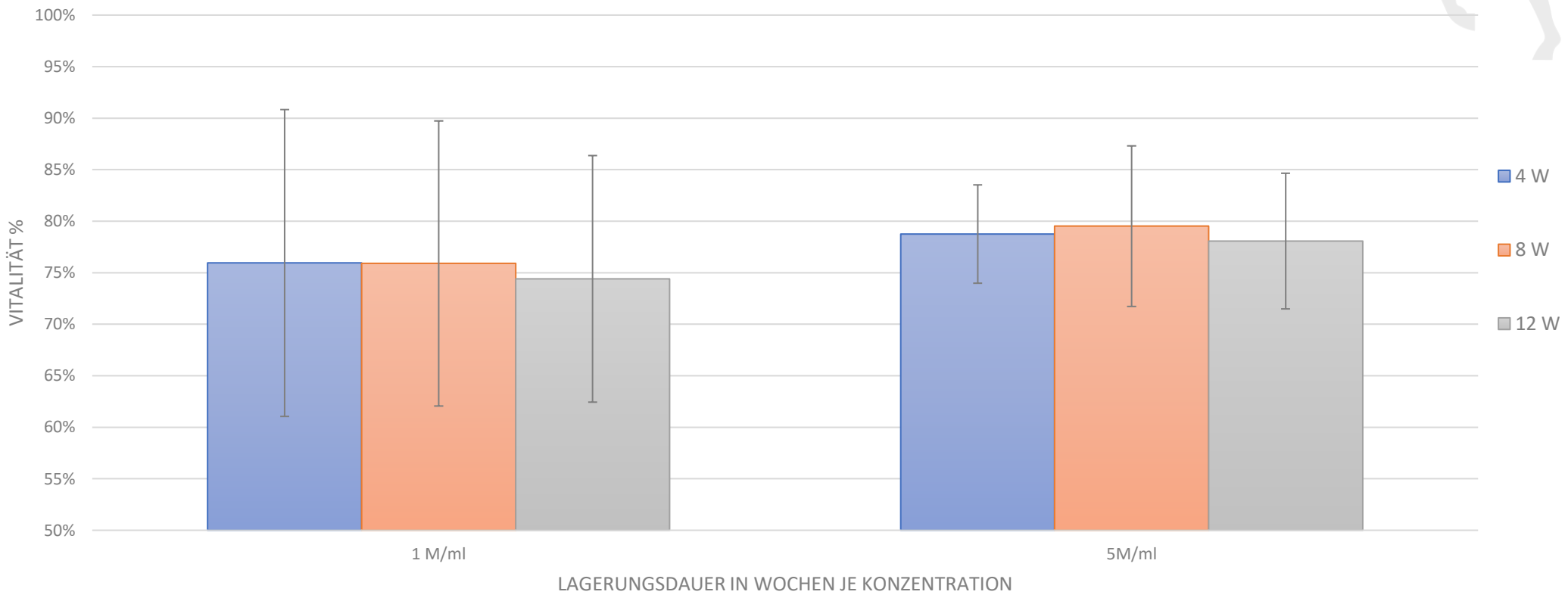
Methoden und Material | Prozessablauf



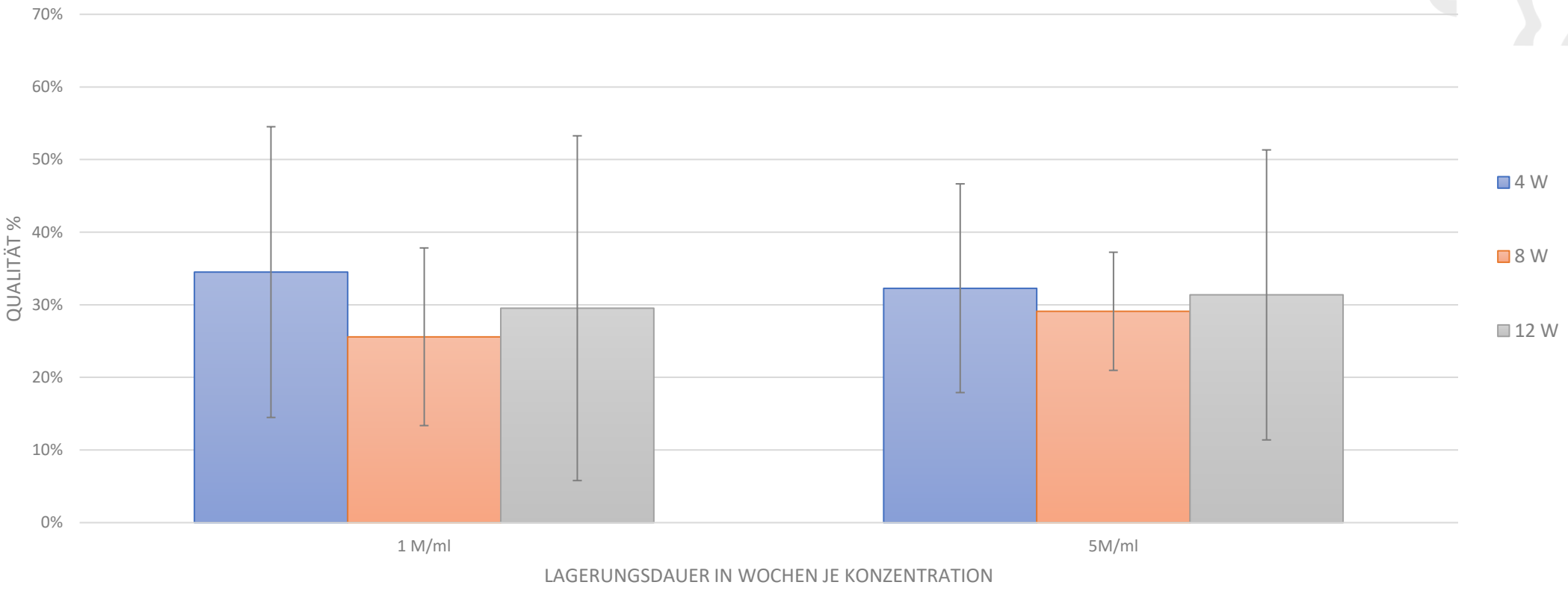
Ergebnisse & Diskussion | Probengruppierung

Tier								
Name	Lucas			Jubo		Alice		Klemenz
Gesamtanzahl	26			27		15		4
Sortierung	10	8	8	17	10	10	5	4
Zusammensetzung [$\times 10^6$/ml]	0,2/0,2	1/0,2	1/1	5/1	1/1	1/0,2	1/1	1,1/1
Verteilung nach (4-8-12 Wochen)	3-3-4	2-3-3	2-3-3	5-6-6	3-3-4	3-3-4	2-2-1	0-0-4

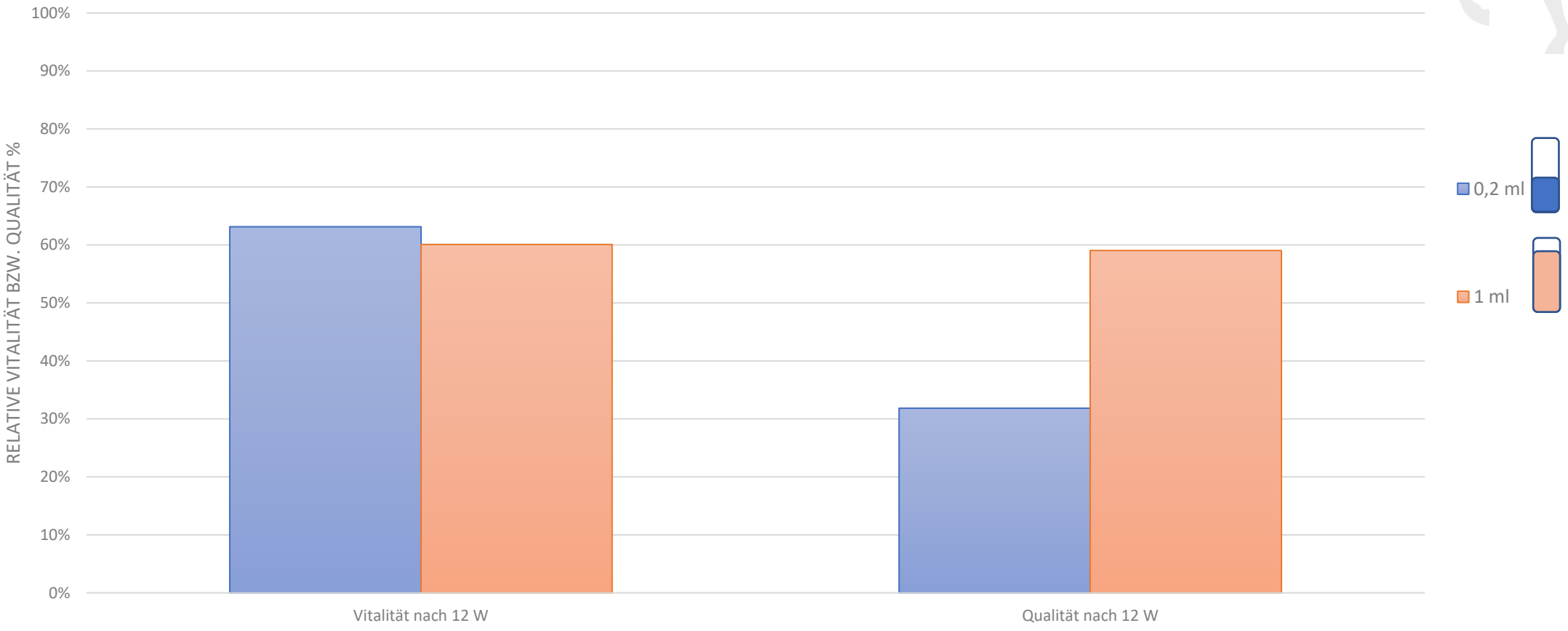
Ergebnisse & Diskussion | Vitalität



Ergebnisse & Diskussion | Qualität

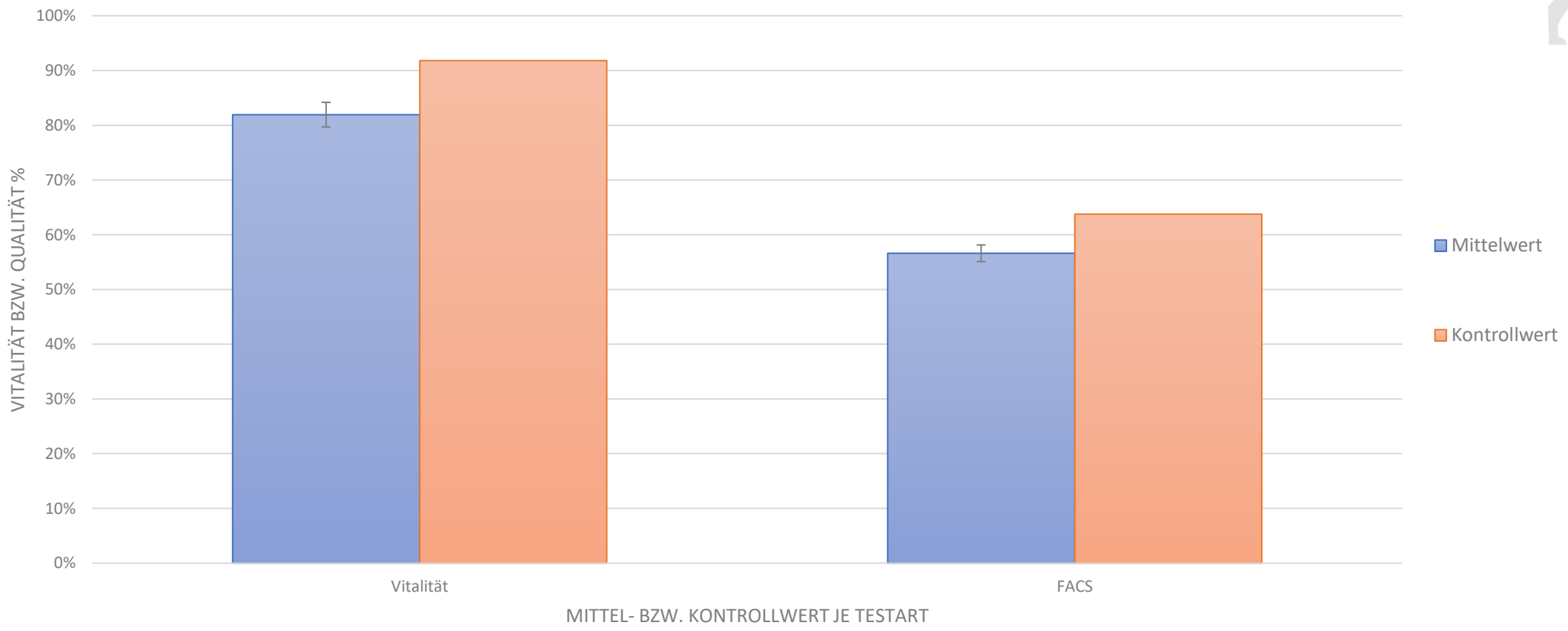


Ergebnisse & Diskussion | Gesamtvolumen



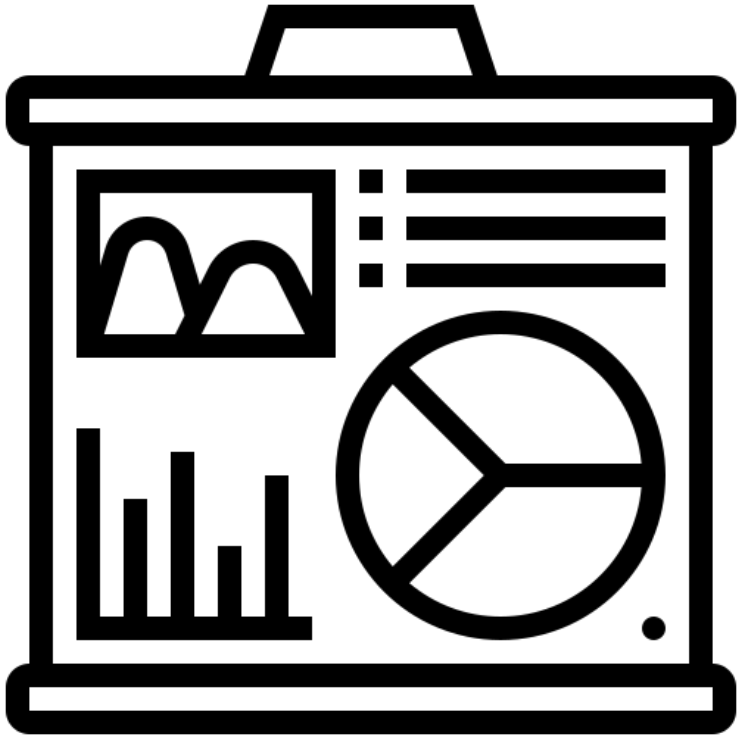
Ergebnisse & Diskussion | Canine Proben

c = 1,1 ×10^6/ml | CPA 10%DMSO + 90% NaCl 0,9% | 12 Wochen



Zusammenfassung

- Ein Kryokonservierungsprotokoll (Vitalität über 74%)
- Keine quantitative Veränderung der Vitalität mit der Zeit
- Konzentration von 5×10^6/ml
- Probenvolumen 1 ml
- NaCl als Alternative für Serum



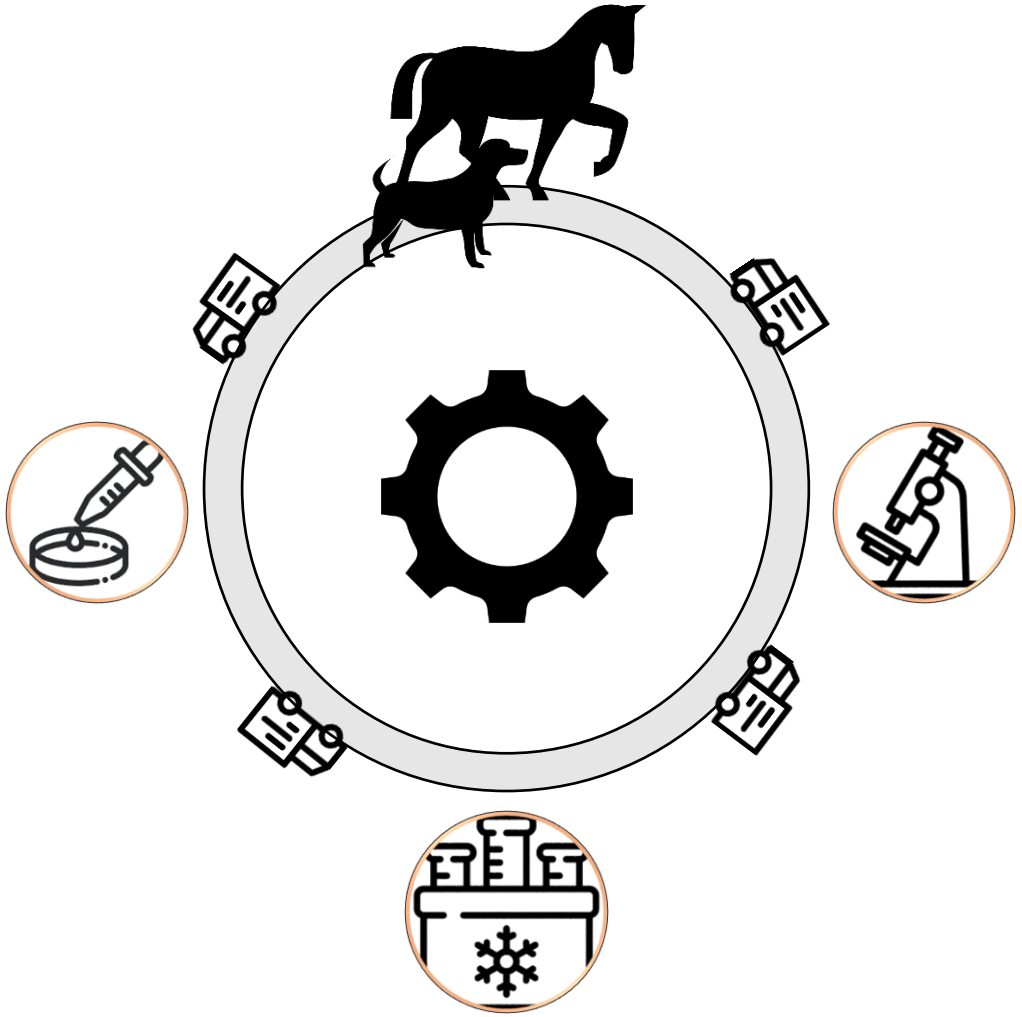
Ausblick und ZIM-Forschungsprojekt

Die Optimierung der Versorgungskette

1. Protokollentwicklung für die Kryokonservierung caniner sowie equiner Zellen

2. Größerer Umfang an qualitativen und quantitativen Post-Thaw-Untersuchungen

3. Überprüfung der Reinheit von Endprodukten



Protokollentwicklung für die Kryokonservierung

1. **Formulierung der Gefrierschutzlösung**
2. Kühlratenoptimierung
3. **Einfluss der Lagertemperatur (-196°C und -80°C)**
4. Einfluss der Lagerdauer
5. **Optimierung der Auftautemperatur und -geschwindigkeit**

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Quellen

PETBIOCELL: Dendritische Zelltherapie. URL https://www.petbiocell.de/dendritische-zelltherapie. – Aktualisierungsdatum: 2020-06-04 – Überprüfungsdatum 2021-09-30

HUNT, Charles J. (Hrsg.): Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling, 2017 (1590)

Mr. Frosty™ Gefrierbehälter. URL https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5100-0001#/5100-0001. – Aktualisierungsdatum: 2021-09-28 – Überprüfungsdatum 2021-09-28

Corning™ CoolCell™, purple cell freezing container for 12 v - Kryo- und Tiefkühlboxen Boxes. URL https://www.fishersci.de/shop/products/coolcell-cell-freezing-vial-containers-2/15542771. – Aktualisierungsdatum: 2021-09-28 – Überprüfungsdatum 2021-09-28

POLY TEMP SCIENTIFIC: CryoMed Controlled-Rate Freezer | 14 custom freezing profiles | -180°C to 50°C | Poly Temp Scientific. URL https://polytemp.com/products/cryogenic-storage/auto-fill-ln2/cryomed-controlled-rate-freezer-14-custom-freezing-profiles-180c-to-50c. – Aktualisierungsdatum: 2021-09-28 – Überprüfungsdatum 2021-09-28

CYTIVA: VIA Freeze Controlled-Rate Freezers - Cytiva. URL https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/cell-therapy/systems/via-freeze-controlled-rate-freezers-p-09721. – Aktualisierungsdatum: 2021-09-28 – Überprüfungsdatum 2021-09-28

Cryogenic / Cryopreservation - Temperature Control / Nitrogen Container - Large Sample Storage Tanks / BR Series | Francelab. URL http://www.francelab.hu/products/cryogenic/7/cryopreservation-temperature-control/large-cryogenic-sample-storage-tanks/cryodiffusion/br-series. – Aktualisierungsdatum: 2021-09-28 – Überprüfungsdatum 2021-09-28

NAME=, meta: Wasserbad. URL https://k-active.com/marken/heuser/528/wasserbad?c=190. – Aktualisierungsdatum: 2021-09-28 – Überprüfungsdatum 2021-09-28