

Institut für Luft- und Kältetechnik gemeinnützige Gesellschaft mbH

Die Entwicklung von Kryoprotokollen mit einem GMP-gerechten Handling-System für die Kryokonservierung in Biobanken

Dr. Gabriele Spörl, Dr. Gretel Wittenburg



- ▶ ILK Dresden
- ▶ Ausgangssituation zur Kryokonservierung
- ▶ Etablierung Modellgewebe (Mundschleimhaut)
- ▶ Vorstellung der Hardware-Komponenten
- ▶ Vorbereitung GMP
- ▶ Ergebnisse/Zusammenfassung

Neugründung 1990
(2014: 50-jähriges Bestehen)

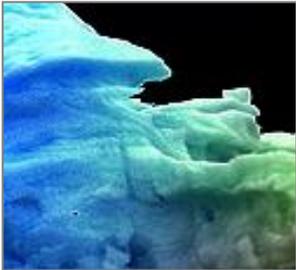
Institutsleitung: Dr. habil. R. Herzog

Vertretung: Prof. Dr.-Ing. U. Franzke



- ▶ 150 Mitarbeiter
- ▶ Finanzierung über
 öffentlichen Hand (60%)
 Industrie (40%)

HB1



**Kryotechnik und
Tiefemperatur-
physik**

HB2



**Kälte- und
Wärmepumpen-
technik**

HB3



**Luft- und
Klimatechnik**

HB4



**Angewandte
Werkstofftechnik**

HB5



**Angewandte
Energietechnik**



Kryotechnik (Technik für Temperaturen von -150°C bis nahe -273°C):

Kryokühler, Kryostate, kryotechnische Komponenten

Technik zur Erzeugung, Lagerung und Anwendung von Wasserstoff, Helium, etc.

Anlagen/Geräte zur Erzeugung von Temperaturen für $T < 1\text{ K}$

Tiefemperaturphysik (Untersuchung der Grundlagen zu Materialien und Techniken):

Materialuntersuchungen, Supraleiterentwicklung, etc.

Life Science (Erfahrungen seit über 30 Jahren):

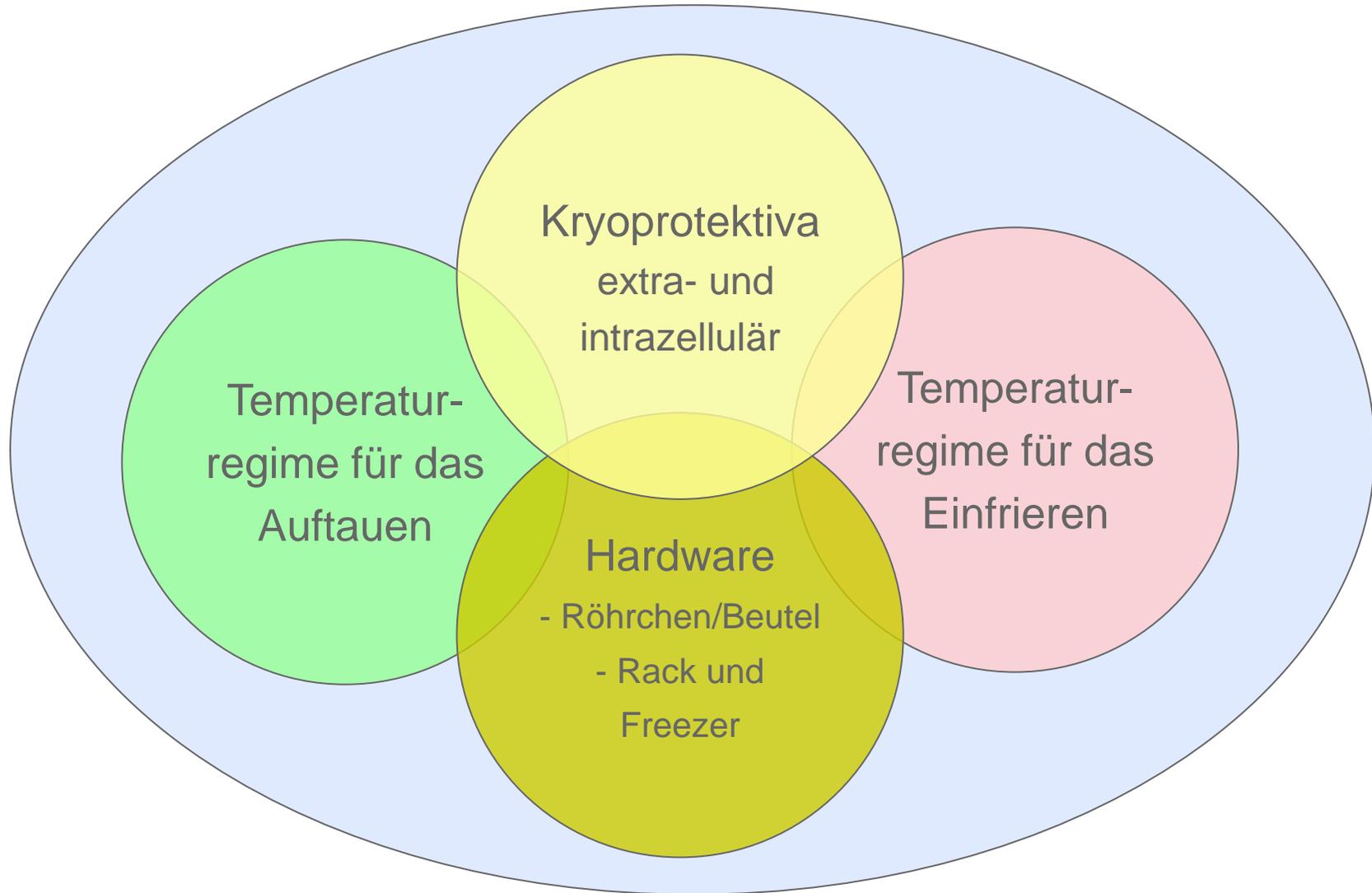
Kryokonservierung, Kryomedizin, Erzeugung von Biomaterialien, Pharmazeutisches Freezing



Kryokonservierung von (Tissue Engineering) Gewebe

- Mundschleimhaut -

mit einer Vitalität von mindestens 75%
nach dem Auftauen,
auch nach 48 Stunden
für die Transplantation



Modellgewebe: Mundschleimhaut
(z.B. MKG-Bereich: Transplantatversorgung)

▶ Besiedlung von Kollagenschwämmen:

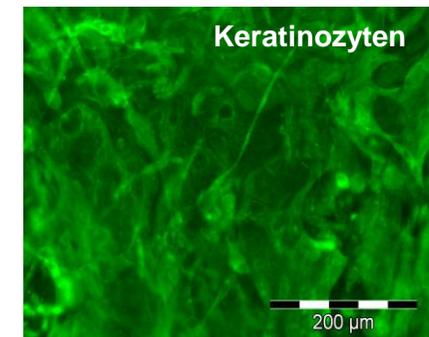
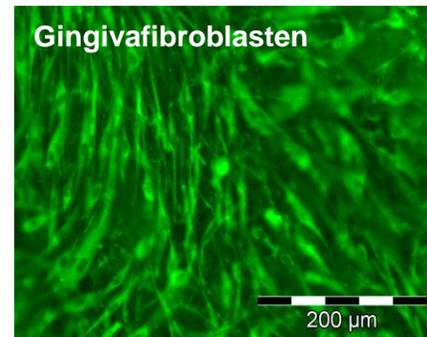
- + Fibroblasten
- + Keratinozyten
- + Endothelzellen



▶ Kultivierung vor und nach Kryokonservierung (für aseptische Umgebung) in evaluierten, **angepassten** Zellkulturmedien

▶ Nachweis der Zellverteilung/Vitalität und Proliferation über:

- ▶ Schnellkontrolle DIO
- ▶ Proliferationsassay
- ▶ Histologische Schnitte
+ Trichrom-Färbungen



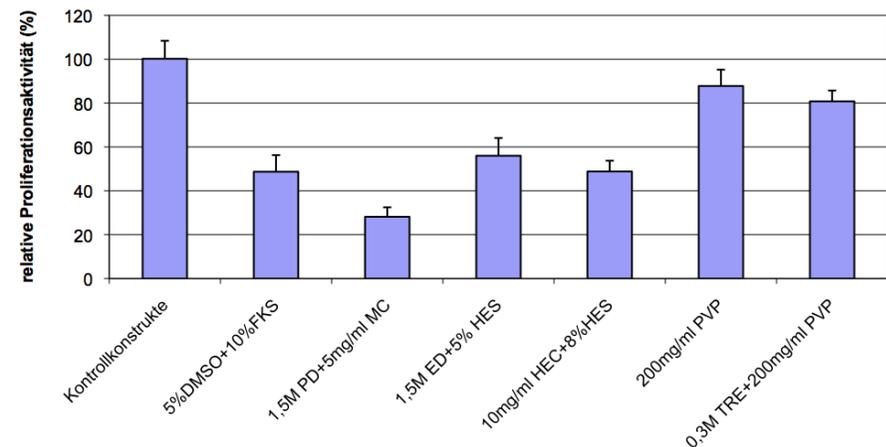
Ziel: Identifizierung nichttoxischer Kryoprotektiva mit hohen Vitalitätsraten

Kryoprotektiva

Revitalisierungsrate

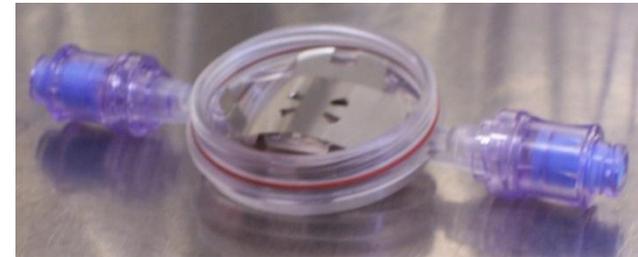
Mean \pm SD

5% Dimethylsulfoxid und 10 % Serum (Standard)	48% \pm 8%
1,5 M 1,2-Propandiol und 5 mg/ml Methylcellulose	28% \pm 4%
1,5 M 1,2-Ethandiol und 5 % HES	56% \pm 8%
10 mg/ml Hydroxyethyl cellulose und 8 % HES	49% \pm 5%
0,3 M Trehalose und 200 mg/ml Povidon	81% \pm 5%
200 mg/ml Polyvinylpyrrolidon	88% \pm 7%



Anforderungen:

- ▶ Gewebe aufbewahren/kultivieren und ggf. fixieren
- ▶ Gewebe aufbewahren/einfrieren und lagern
- ▶ Gewebe auftauen/lagern
- ▶ Gewebe revitalisieren
- ▶ Ggf. aseptisch arbeiten



→ **Dose** mit Anschlüssen und Fixierungseinheiten (2 Arten)



Anforderungen:

- ▶ Dosen mit Gewebe halten/einfrieren und lagern
- ▶ Dosen mit Gewebe auftauen
- ▶ einsetzbar in Standard-Einfriergeräten
- ▶ Management des Kälte-/Wärmeeintrags in das Gewebe
(Verhinderung von Eisablagerungen an Wärme übertragenden Flächen)

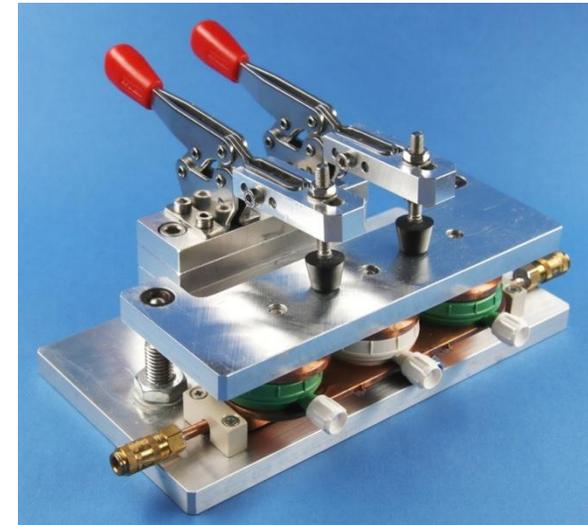
→ KryoRACK

zur Dosenhalterung

zum Einfrieren + Lagern + Auftauen

mit durchströmbaren Wärmetauschern

zur Entwicklung von Kryoprotokollen (Einfrierregime)



Anforderungen:

- ▶ Gewebe in Dosen hinreichend schnell auftauen
- ▶ Gewebe in Dosen sicher auftauen
- ▶ Gewebe in Dosen reproduzierbar auftauen
- ▶ Management des Kälte-/Wärmeeintrags in das Gewebe

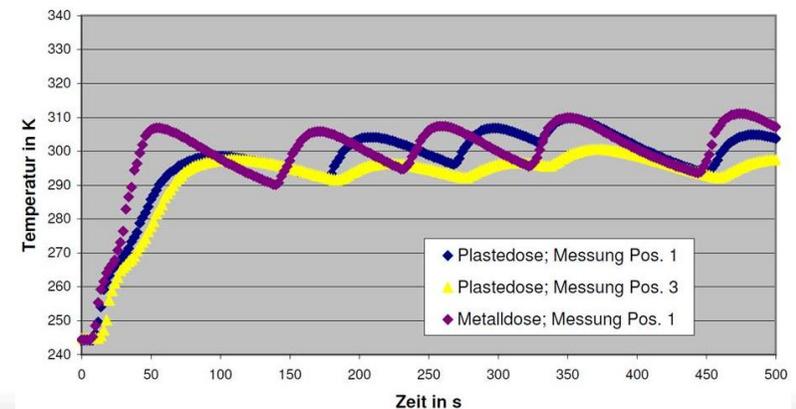
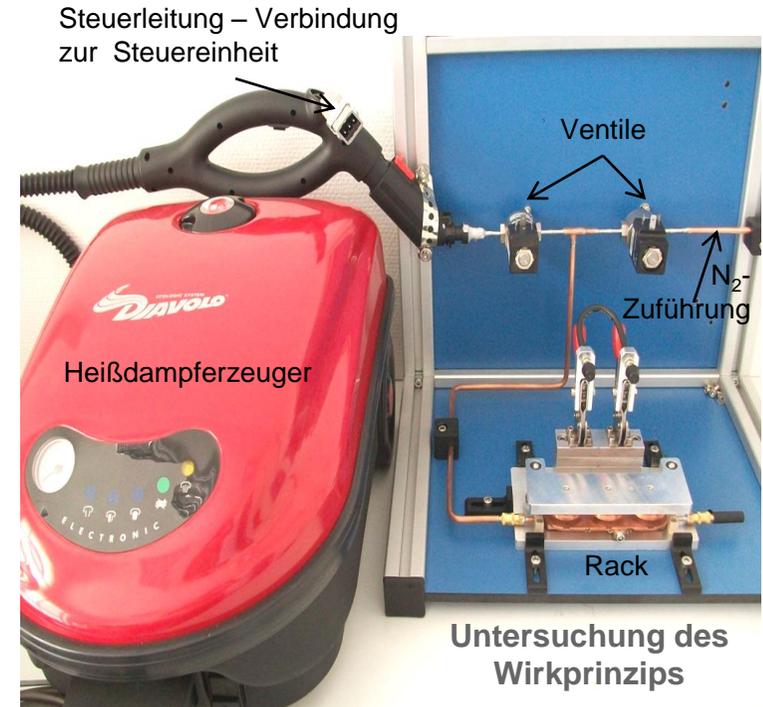
→ Auftaueinheit

zum Auftauen der Gewebe

mittels gepulstem N_2 -Gas getragenen Heißdampf



Temperaturüberwachung



Anforderungen:

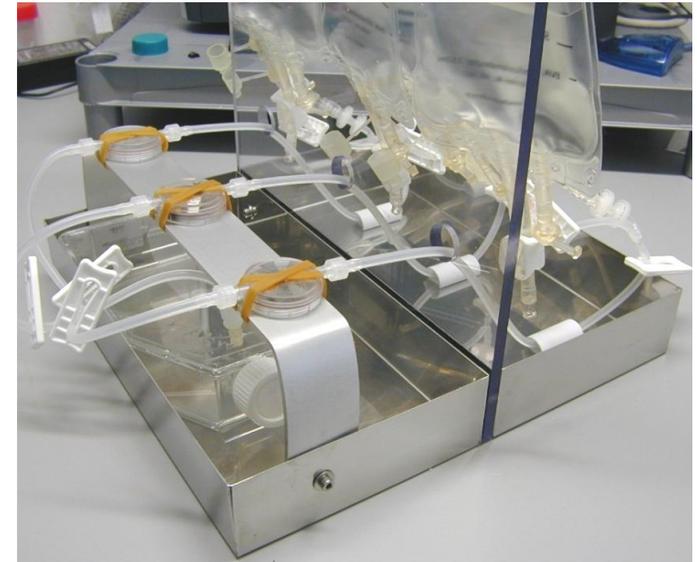
- ▶ Kryoprotektiva von Geweben in Dosen entfernen
- ▶ Spülen
- ▶ Zugabe der Revitalisierungs- (Erhaltungs-) medien zu den Geweben in Dosen, mit zeitlicher Vorgabe
- ▶ Verwendung in aseptischer Umgebung
- ▶ Verwendbarkeit von sterilem Standardmaterial

→ Spül- und Versorgungsstation

zum Entfernen der Kryoprotektiva

zum Zufügen von Revitalisierungs- bzw. Erhaltungsmedium

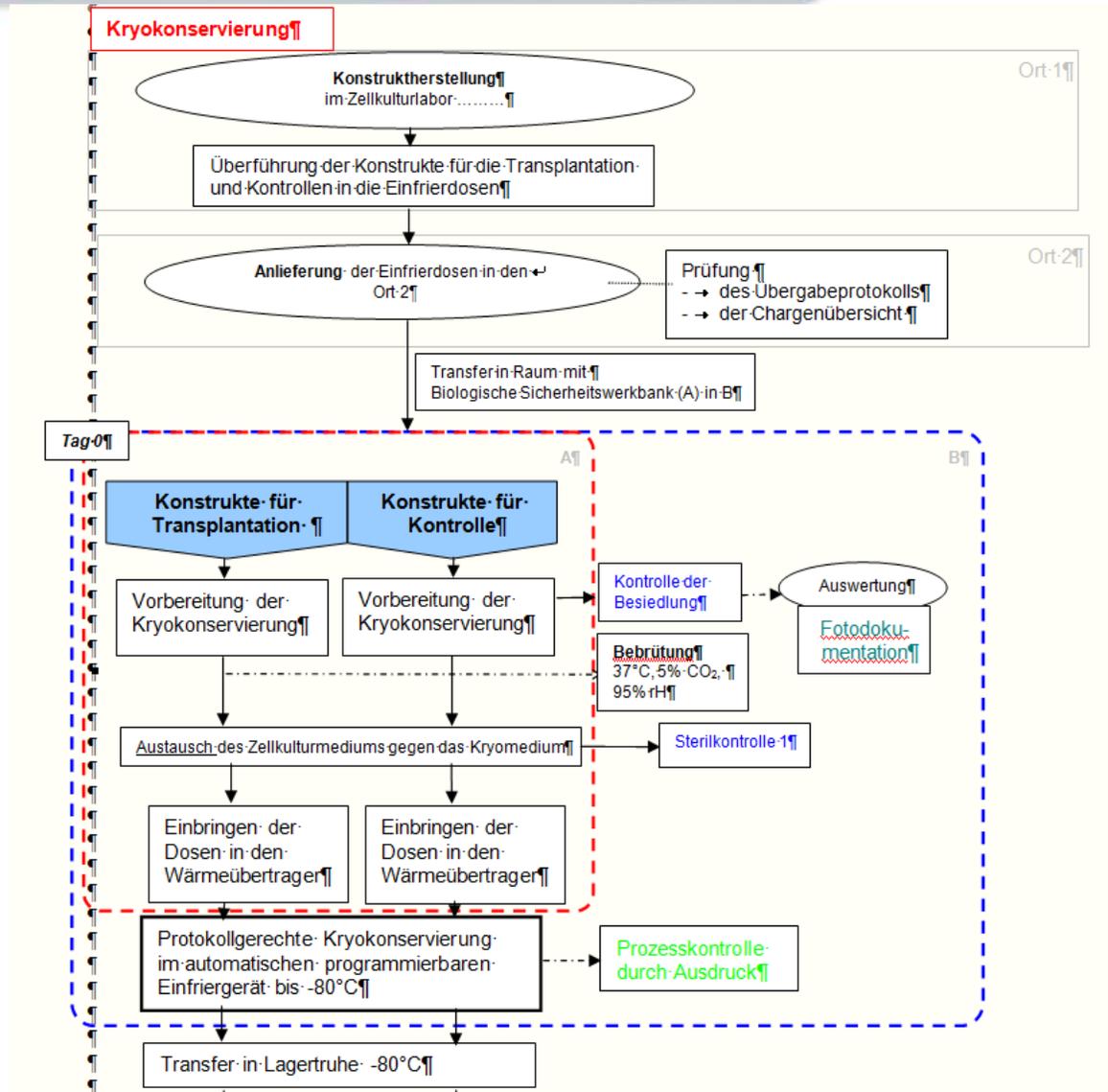
zum Aufbewahren der Gewebe bis zu 48 Stunden



Kryokonservierung und GMP



Auszug aus SOP-Erstellung für die Kryokonservierung





- ▶ **Zuverlässige Herstellung** von 3D-Tissue-Engineering-Konstrukten der Mundschleimhaut.
- ▶ Etablierung von **Kryoprotokollen** unter Verwendung des **KryoRACK**.
- ▶ **Kryomedium 200 mg/ml PVP** mit bester kryoprotektiver Wirkung für die Mundschleimhaut-Konstrukte (Revitalisierungsrate von 88%).
- ▶ **Auftaeinheit** taut die Konstrukte zuverlässig auf.
- ▶ Empfehlung einer **Revitalisierungszeit** von mindestens 18 Std. nach dem Auftauen der Konstrukte für verbesserte Einheilung nach Transplantation.
- ▶ Die **Spül- und Versorgungsstation** erlaubt Gewebeerhaltung von mehr als 48 Std. unter **aseptischen Bedingungen**.
- ▶ Die Etablierung der **DIO-sofort-Färbung** ist für die **Qualitätskontrolle** einsetzbar.



Alle Komponenten des Handling-Systems wurden

- ▶ als Labor-Funktionsmuster entwickelt
- ▶ als Muster technisch-funktionell getestet
- ▶ als Muster biologisch-funktionell getestet (im Labor und im Tiermodell)
- ▶ aus geeigneten Materialien konzipiert (z.B. biokompatibel und kältefest)

Ausblick

Alle Komponenten des Handling-Systems müssen

- ▶ als Medizinprodukt* für GMP-Einsatz gefertigt und zugelassen werden
- ▶ zu interessierten Firmen transferiert werden

* entsprechend Klassifizierung des MPG

Bearbeitung in mehreren Projekten unter Mitwirkung verschiedener Kooperationspartner.

Förderung durch

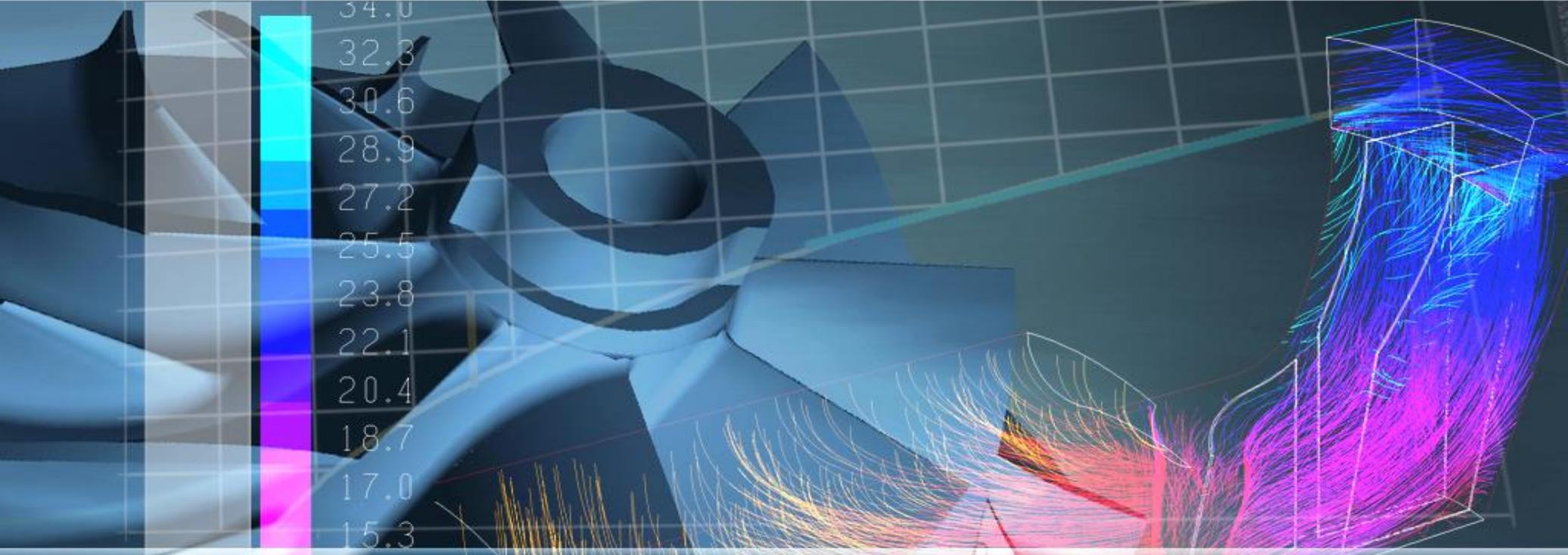
- ▶ die Sächsische Aufbaubank,
FKZ 7953/1272 und 10957/1700 für das ILK Dresden und
FKZ 7954/1272 sowie 10987/1700 für die TU Dresden, MKG-Klinik,
mit Kooperationspartner IBN GmbH Dresden Gesellschaft für industrielle Forschung und Technologie und
die Ingenieurbüro und Plastverarbeitung Quinger GmbH.
- ▶ Euronorm
FKZ MF 090193 für das ILK Dresden
- ▶ die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF) für das Kooperationsprojekt
zwischen der Acuros GmbH (FKZ ZIM-KF 2392801FO9) und der TU Dresden, MKG-Klinik (FKZ ZIM-KF 2388001FO9)



Besonderer Dank an

- ▶ Prof. Dr. Dr. Günter Lauer von der TU Dresden, MKG-Klinik,
- ▶ Prof. Dr. Dirk Labudde von der FH Mittweida,
- ▶ Frau Edith Klingner von der edecto GmbH (Ausgründung aus der IBN GmbH).
- ▶ Herrn Joachim Quinger von der Quinger GmbH





Institut für Luft- und Kältetechnik

Gemeinnützige Gesellschaft mbH
Bertolt-Brecht-Allee 20
01309 Dresden

Dr. rer. nat. Gabriele Spörl

Hauptbereich Kryotechnik und Tieftemperaturphysik

Tel.:	+49 351 4081-604
Fax:	+49 351 4081-635
E-Mail:	gabriele.spoerl@ilkdresden.de
Internet:	www.ilkdresden.de
