

CryoSure-DEX40

- (EN)** Cryoprotectant for the cryopreservation of hematopoietic stem cells for transplantation
- (DE)** Kryoprotektivum zur Kryokonservierung hämatopoetischer Stammzellen, die zur Transplantation bestimmt sind
- (F)** Solution cryoprotectrice employée pour la cryoconservation des cellules souches hématopoïétiques à visée thérapeutique

(EN) Sterile acc.to EP/USP	Pyrogen-free acc. to EP	Endotoxin-free acc. to EP/USP	Free of mycoplasma acc. to EP
(DE) Steril gem. EP/USP	Pyrogenfrei gem. EP	Endotoxinfrei gem. EP/USP	Frei von Mykoplasmen gem. EP
(F) Stérile selon Ph. Eur./USP	Exempt de pyrogènes selon Ph. Eur.	Exempt d'endotoxines bactériennes selon Ph. Eur./USP	Exempt de mycoplasmes selon Ph. Eur.

(EN) Ingredients:	55 g/dl DMSO USP Grade, 5 g/dl Dextran 40 USP Grade, water for injection EP
(DE) Inhaltsstoffe:	55 g/dl DMSO USP Grade, 5 g/dl Dextran 40 USP Grade, Wasser für Injektionszwecke EP
(F) Ingrédients:	55 g/dl DMSO USP Grade, 5 g/dl Dextrane 40 USP Grade, eau pour préparations injectables selon Ph. Eur

CE
0482



WARNING: Do not autoclave. **Do not use unless solution is clear.** **Not for injection.**
ACHTUNG: Nicht autoklavieren. **Nur klare Lösung verwenden.** **Nicht injizieren.**
ATTENTION: Ne pas passer en autoclave. **Seulement utiliser la solution claire.** **Ne pas injecter.**

STERILE A

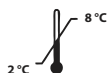
Sterilized through aseptic processing.
Sterilisiert durch Anwendung aseptischer Verfahrenstechniken.
Stérilisé par des technologies aseptiques.



Do not resterilize.
Nicht erneut sterilisieren.
Ne pas restériliser.



Use by date: see product labelling
Verwendbar bis: siehe Produktetikett
Employable jusqu'à: regardez l'étiquette de produit



Store at 2 °C to 8 °C.
Bei 2 °C bis 8 °C lagern.
Conserver à 2 °C jusqu'à 8 °C.



Do not expose to sunlight.
Von Sonnenlicht fernhalten.
Protéger de lumière forte.

LOT

Batch code: see product labelling
Chargennummer: siehe Produktetikett
Numéro de lot: regardez l'étiquette de produit



Not to be used in case package is damaged.
Bei beschädigter Verpackung nicht verwenden.
Ne pas utiliser en cas d'emballage mutilé.



Read usage instructions.
Gebrauchsanweisung beachten.
Suivez le mode d'emploi.

REF

WAK-DEX40-25 (25 x 8 ml vial)



Date of manufacture: see product labelling
Herstellungsdatum: siehe Produktetikett
Date de production: regardez l'étiquette de produit



WAK-Chemie Medical GmbH

Siemensstraße 9 D-61449 Steinbach/Ts
Tel. +49 61 71 / 28 43 0 • Fax +49 61 71 / 69 56 46
E-Mail: info@wak-chemie.com • www.wak-chemie.com



Instructions for use CryoSure-DEX40 Bedienungsanleitung CryoSure-DEX40 Mode d'emploi CryoSure-DEX40

Introduction:

- (EN) CryoSure-DEX40 is employed in the course of longterm storage and cell counting of hematopoietic stem cell preparations.

CryoSure-DEX40 is a ready-to-use cryoprotective solution for the addition to a buffy coat suspension from volume-reduced cord blood according to the method of Rubinstein et al (1). CryoSure-DEX40 is a solution consisting of 50% v/v DMSO and 50% v/v of a 10% aqueous solution of Dextran 40.

Einleitung:

- (DE) CryoSure-DEX40 wird im Rahmen der Langzeitlagerung und Zellzahlbestimmung von hämatopoetischen Stammzellpräparaten eingesetzt.

CryoSure-DEX40 ist eine gebrauchsfertige kryoprotektive Lösung zur Zugabe zu einem nach der Methode von Rubinstein et al angefertigten Buffy-Coat-Konzentrat aus volumenreduzierten Nabelschnurblut (1). CryoSure-DEX40 ist eine Lösung bestehend aus 50 % v/v DMSO und 50 % v/v einer 10%igen wässrigen Dextran 40-Lösung.

Introduction:

- (F) CryoSure-DEX40 est appliqué dans le cadre du long stockage et détermination des nombres des cellules des préparations des cellules souches hématopoïétiques.

CryoSure-DEX40 est une solution cryoprotectrice prête à l'emploi pour ajouter à un concentré de sang de cordon ombilical réduit de volume contenant la couche leuco-plaquettaire, produit selon la méthode de Rubinstein et al (1). CryoSure-DEX40 est une solution se composant de 50 % v/v de DMSO et de 50 % v/v d'une solution aqueuse de 10 % de Dextrane 40.

EN It contains the cryoprotectants DMSO and Dextran 40, which have their effects inside and outside the cell, respectively.

DMSO (Dimethyl Sulfoxide) is a cryoprotectant which penetrates the cell wall and takes its cryoprotectant effect within the cell. It reduces the osmotic stress on the cells during freezing and thawing (2, 3, 4, 5, 6) and antagonizes the osmotic shock (7). Also DMSO protects the cells by reducing dehydration and shrinkage of the cells during the freezing process (5, 8). After thawing DMSO has to be removed from the stem cell suspension by means of wash centrifugation. According to the protocol of Rubinstein et al the DMSO concentration in the volume-reduced ready-to-freeze endvolume is 10% v/v. Before freezing and after thawing DMSO is potentially cytotoxic. The cytotoxicity is dependent on the DMSO concentration, the time of exposure and the temperature of the stem cell suspension during the time of exposure to DMSO (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

Therefore the stem cell suspension has to be kept cool at 2 °C whilst CryoSure-DEX40 is added to and removed from the stem cell suspension before freezing and after thawing, respectively. The addition of DMSO and the washing process of the stem cell suspension have to be started immediately before freezing and after thawing, respectively. In case of adequate cooling and immediate handling of the stem cell suspension during DMSO exposure in the unfrozen state, no relevant adverse effects on the cells are observed at endvolume concentrations of DMSO between 5 and 10% (15, 16, 17, 18).

Since DMSO is a strong aprotic solvent, special care has to be taken to only use DMSO-compatible materials for withdrawal of the DMSO from the vial and during transition of the DMSO to the target suspension and to minimize the contact time of DMSO with such materials. This applies even more the higher the concentration of DMSO. All processes related to the application and elimination of CryoSure-DEX40 have to be validated by the user.

The cell counting procedures carried out before freezing respectively after thawing are to be conducted by the user applying validated methods.

Storage:

CryoSure-DEX40 has a shelf life of 24 months after production if stored at 2 °C to 8 °C.

Transport:

CryoSure-DEX40 is shipped in Styrofoam boxes with ice packs to maintain a low shipping temperature. Based on stability data at elevated temperatures a transient exposure of the product to elevated temperatures during transportation should not exceed 30°C for 2 weeks. Consequently, the transient violation of the nominal storage temperature for a limited period of time, such as

DE CryoSure-DEX40 wird im Rahmen der Langzeitlagerung und Zellzahlbestimmung von hämatopoetischen Stammzellpräparaten eingesetzt.

CryoSure-DEX40 ist eine gebrauchsfertige kryoprotektive Lösung zur Zugabe zu einem nach der Methode von Rubinstein et al angefertigten Buffy-Coat-Konzentrat aus volumenreduzierten Nabelschnurblut (1). CryoSure-DEX40 ist eine Lösung bestehend aus 50 % v/v DMSO und 50 % v/v einer 10%igen wässrigen Dextran 40-Lösung.

Sie beinhaltet das intrazellulär wirkende Kryoprotektivum DMSO und das extrazellulär wirkende Kryoprotektivum Dextran 40.

DMSO (Dimethylsulfoxid) ist ein die Zellmembran penetrierendes und im Zellinnern wirkendes Gefrierschutzmittel. Es vermindert die osmotische Belastung der Zellen während des Einfrierens und Auftauens (2, 3, 4, 5, 6) und wirkt dem osmotischen Schock entgegen (7). Weiterhin schützt es die Zellen durch Verminderung der Dehydrierung und Schrumpfung der Zellen während des Einfrierprozesses (5, 8). Nach Auftauen wird das DMSO wieder aus dem Stammzellpräparat entfernt. Das Entfernen erfolgt mittels Waschcentrifugation. Entsprechend des Protokolls von Rubinstein et al beträgt die DMSO-Konzentration im volumenreduzierten einzufrierenden Endvolumen 10 % v/v. Vor dem Einfrieren bzw. nach dem Auftauen ist das DMSO potentiell zytotoxisch. Die Zytotoxizität ist abhängig von der DMSO-Konzentration, von der Expositionsdauer und von der Temperatur der Stammzellsuspension während der Exposition (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

Im ungefrorenen Zustand muss die Stammzellsuspension daher ab Zugabe bis zum Entfernen des CryoSure-DEX40 bei +2 °C temperiert werden. Die Zugabe des DMSO muss unmittelbar vor dem Einfrieren bzw. das Auswaschen des DMSO unmittelbar nach dem Auftauen begonnen werden. Bei entsprechender Kühlung ist bei den genannten DMSO-Konzentrationen zwischen 5 bis 10 % bei unverzüglicher Prozessierung keine relevante Beeinträchtigung der Zellen zu beobachten (15, 16, 17, 18).

Da DMSO ein starkes aprotisches Lösungsmittel ist und sowohl lipophile als auch hydrophile Substanzen löst, ist während der Entnahme und der Überleitung von DMSO darauf zu achten, möglichst DMSO-kompatible Materialien zu verwenden und die Kontaktzeit mit ihnen so gering wie möglich zu halten. Dies gilt umso mehr, je höher die DMSO-Konzentration ist, mit der die betreffenden Materialien in Kontakt geraten. Alle Prozesse, die die Zugabe sowie das Auswaschen von CryoSure-DEX40 betreffen, müssen durch den Anwender validiert werden.

Die Zellzahlbestimmungen vor dem Einfrieren respektive nach dem Auftauen sind nach durch den Anwender validierten Methoden durchzuführen.

F CryoSure-DEX40 est appliqué dans le cadre du long stockage et détermination des nombres des cellules des préparations des cellules souches hématopoïétiques.

CryoSure-DEX40 est une solution cryoprotectrice prête à l'emploi pour ajouter à un concentré de sang de cordon ombilical réduit de volume contenant la couche leuco-plaquettaire, produit selon la méthode de Rubinstein et al (1). CryoSure-DEX40 est une solution se composant de 50 % v/v de DMSO et de 50 % v/v d'une solution aqueuse de 10 % de Dextrane 40.

La solution contient l'agent cryoprotecteur DMSO qui a son effet cryoprotecteur dans l'intérieur de la cellule et l'agent cryoprotecteur Dextrane 40 qui protège la cellule de l'extérieur.

DMSO (Diméthyle Sulfoxyde) pénètre la membrane cellulaire et a son effet cryoprotecteur à l'intérieur de la cellule. Il réduit le chargement osmotique des cellules pendant la congélation et la décongélation (2, 3, 4, 5, 6) et contre-carre le choc osmotique (7). En plus il protège les cellules de la déshydratation et de l'affaissement pendant la congélation (5, 8). Après la décongélation de la préparation de cellules souches hématopoïétiques la solution cryoprotectrice est éliminée de la préparation. Cette élimination est effectuée par centrifuger et laver.

Selon le protocole de Rubinstein et al la concentration de DMSO dans le concentré de sang de cordon ombilical réduit de volume se monte à 10 % v/v. Avant la congélation respectivement après la décongélation le DMSO est potentiellement cytotoxique. La cytotoxicité est dépendante de la concentration de DMSO dans la suspension de cellules, de la durée de l'exposition des cellules au DMSO et de la température de la suspension pendant l'exposition au DMSO (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

Ainsi dans l'état non-congelé la suspension de cellules doit être réfrigérée à 2 °C depuis que CryoSure-DEX40 soit ajouté aux cellules jusqu'à l'élimination du DMSO de la suspension décongelée. Après avoir ajouté le DMSO à la suspension de cellules il faut immédiatement commencer avec le processus de congélation de la suspension. Respectivement après la décongélation de la suspension de cellules il faut immédiatement commencer avec l'élimination de DMSO de la suspension. En cas la suspension est adéquatement réfrigérée et procédée sans délai pas d'atteinte pertinente est escomptée pour les cellules souches hématopoïétiques si la concentration du DMSO est entre 5 et 10 % (15, 16, 17, 18).

Parce que DMSO est un solvant aprotique fort il est impératif de prendre garde à employer des matériaux compatibles avec le DMSO et de tenir la durée de l'exposition du DMSO à ces matériaux le plus court possible, d'autant plus que la concentration du DMSO augmente. Tous les processus d'application et de

EN during transportation, does not have a negative effect on the product quality of CryoSure-DEX40. Cold chain transportation as well as temperature monitoring during transportation are therefore not necessary.

DE Lagerung:
CryoSure-DEX40 ist bei 2 °C bis 8 °C für 24 Monate ab Herstellung haltbar.

Transport:
CryoSure-DEX40 wird in Styroporboxen mit Kühlelementen versandt, um eine möglichst niedrige Transporttemperatur zu gewährleisten. Auf Grundlage von Stabilitätsdaten bei erhöhten Temperaturen sollte eine vorübergehende Exposition des Produkts zu erhöhten Temperaturen während des Transport 30°C und 2 Wochen nicht überschreiten. Demzufolge hat eine vorübergehende Überschreitung der nominellen Lagersolltemperatur, zum Beispiel während des Transports, keine negative Auswirkung auf die Produktqualität. Ein Kühlkettenversand sowie ein Temperaturmonitoring während des Transports sind daher nicht notwendig.

F l'élimination de CryoSure-DEX40 doivent être validés par l'utilisateur.

Tous les processus de détermination des nombres de cellules avant la congélation respectivement après la décongélation doivent être validés par l'utilisateur.

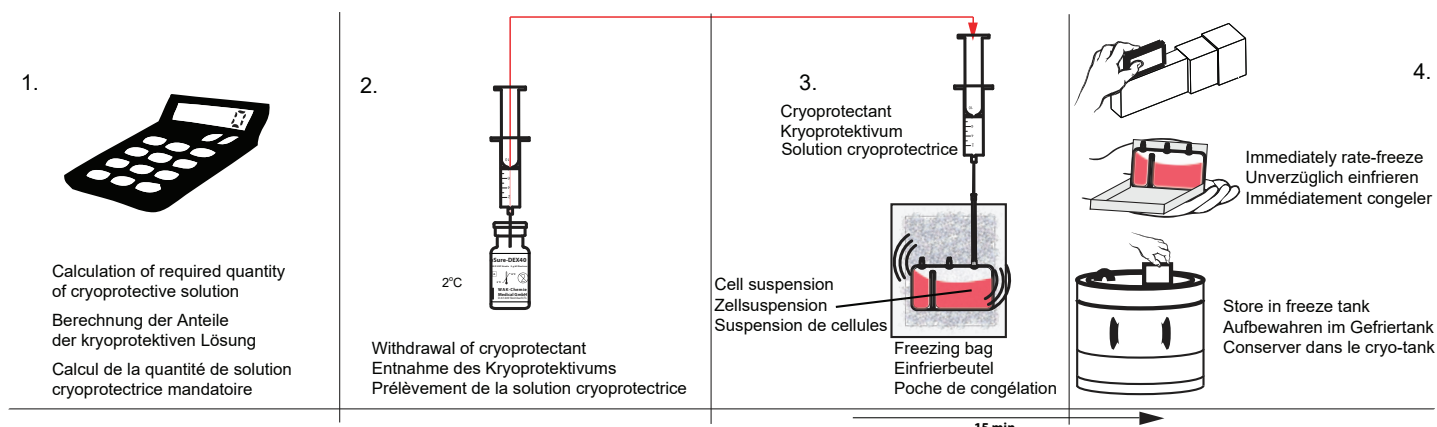
Stockage:
La période de durabilité de CryoSure-DEX40 est 24 mois dès production si stocké de 2 °C à 8 °C.

Transport:
Les boîtes de transport se composent de polystyrène et sont emballées avec des sachets réfrigérés pour maintenir l'état réfrigéré des flacons pendant le transport. En référence des études de stabilité aux températures élevées l'exposition transitoire du produit aux températures élevées pendant le transport ne doit pas dépasser 30°C pour 2 semaines. Par conséquent le dépassement transitoire de la température de stockage nominale à délai limité pendant le temps du transport est acceptable et n'a pas d'effet négatif sur la qualité du produit. Une chaîne de froid ou un contrôle de température pendant le transport ne sont pas jugés nécessaire.

I Addition of CryoSure-DEX40 to the stem cell suspension

Zugabe von CryoSure-DEX40 zur Stammzellsuspension

Addition de CryoSure-DEX40 à la suspension de cellules souches



EN I Addition of CryoSure-DEX40 to the stem cell suspension

CryoSure-DEX40 is added to the volume-reduced cord blood suspension instantaneously as the last step before initiating the freezing process.

1. Calculation of the composition of the cryoprotective solution

The amount of CryoSure-DEX40 to be added to the stem cell suspension has to be chosen in a way so that the envisaged endvolume concentration of DMSO is met. 8 ml of CryoSure-DEX40 contain 4 ml of DMSO (± 4.4 g DMSO). The density of DMSO is 1.1 g/cm^3 under normal conditions. In accordance with the protocol of Rubinstein et al 5 ml of CryoSure-DEX40 are to be added to 20 ml of volume-reduced cord blood. Thus the added 2.5 ml of DMSO result in an endvolume concentration of DMSO of 10% within the ready-to-freeze suspension (1).

2. Withdrawal of CryoSure-DEX40 from the vial and preparation of the cryoprotective solution

Before addition to the stem cell suspension CryoSure-DEX40 is to be cooled to 2°C . The amount necessary to reach the envisaged concentration of CryoSure-DEX40 in the endvolume is to be taken volumetrically from the vial.

3. Addition of the cryoprotective solution to the suspension of hematopoietic stem cells

Before addition of CryoSure-DEX40 the stem cell suspension is placed on an ice bed and cooled to 2°C . Thereafter CryoSure-DEX40, which has also been cooled to 2°C , is added volumetrically to the stem cell suspension at a constant velocity within a period of 15 minutes until the designated endvolume has been reached. Preferably a calibrated syringe pump is to be used for the addition of the cryoprotective solution (1). The consistently decelerated addition of CryoSure-DEX40 containing DMSO provides for the osmotic tolerance of the hyperosmolar DMSO and the cells in the target suspension. During the addition process, the target suspension is continuously and consistently mixed in order to assure a consistent dispensation of the DMSO conveyed within the target suspension (1).

4. Beginning of freezing process

Immediately after having added the complete amount of CryoSure-DEX40 to the target suspension, the freezing process has to be started. Until the beginning of freezing, the temperature of the stem cell suspension ready-to-freeze has to be constantly kept at 2°C . Various standard freezing procedures can be applied as specified in literature. A freezing rate of 1°C/minute until the final freeze-store temperature has been reached is considered applicable for successfully freezing hematopoietic stem cells using DMSO as a cryoprotectant (16).



I Zugabe von CryoSure-DEX40 zur Stammzellsuspension

CryoSure-DEX40 wird der volumenreduzierten Nabelschnurblutsuspension als letzter Schritt unmittelbar vor Beginn des Einfrierprozesses zugegeben.

1. Berechnung der Anteile der kryoprotektiven Lösung

Die zuzugebende Menge an CryoSure-DEX40 ist so zu wählen, dass die avisierte Endvolumenkonzentration an DMSO erreicht wird. In 8 ml CryoSure-DEX40 befinden sich 4 ml DMSO ($\pm 4,4$ g DMSO). Die Dichte von DMSO beträgt im Normzustand $1,1 \text{ g/cm}^3$. Gemäß dem Protokoll von Rubinstein et al werden zu 20 ml volumenreduziertem Nabelschnurblut 5 ml CryoSure-DEX40 zugegeben. Im einzufrierenden Endvolumen resultieren somit 2,5 ml DMSO, was eine Endvolumenkonzentration des DMSO von 10 % ausmacht (1).

2. Entnahme von CryoSure-DEX40 aus der Flasche und Vorbereitung der kryoprotektiven Lösung

CryoSure-DEX40 ist vor Zugabe auf $+2^\circ\text{C}$ zu temperieren. Die für die angestrebte Konzentration von CryoSure-DEX40 im einzufrierenden Endvolumen nötige Menge wird volumetrisch aus der Injektionsflasche entnommen.

3. Zugabe von CryoSure-DEX40 zur Stammzellsuspension

Vor Beginn der Zugabe wird die Stammzellsuspension auf ein Eisbett platziert und auf $+2^\circ\text{C}$ temperiert. Als dann wird das vorgekühlte CryoSure-DEX40 volumetrisch mit gleichmäßiger Zugabegeschwindigkeit über 15 Minuten der Stammzellsuspension bis zum Erreichen des Einfrierendvolumens zugegeben. Vorzugsweise wird hierzu eine kalibrierte Injektionspumpe verwendet (1). Die gleichmäßige verzögerte Zugabe des DMSO-haltigen CryoSure-DEX40 gewährleistet die osmotische Verträglichkeit des hyperosmolaren DMSO mit den Zellen der Zielsuspension. Während der Zugabe wird die Zielsuspension kontinuierlich gleichmäßig durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung des zugeführten DMSO in der Zielsuspension zu erreichen (1).

4. Beginn des Einfriervorgangs

Nach der Zugabe von CryoSure-DEX40 muss unverzüglich mit dem Einfrieren begonnen werden. Bis zum Beginn des Einfrierens ist die Temperatur der einfrierfertigen Stammzellsuspension bei $+2^\circ\text{C}$ konstant zu halten. Zum Einfrieren sind in der Literatur verschiedene Verfahren beschrieben. Als Einfrierate für ein erfolgreiches Einfrieren von hämatopoetischen Stammzellen mit DMSO als Kryoprotektivum wird 1°C/Minute bis zur endgültigen Lagertemperatur angegeben (16).



I Addition de CryoSure-DEX40 à la suspension de cellules souches

CryoSure-DEX40 est ajouté au concentré de sang de cordon ombilical réduit de volume comme la dernière mesure avant de commencer avec le processus de congélation.

1. Calcul de la composition de la solution cryoprotectrice

La quantité de CryoSure-DEX40 à être ajoutée à la suspension de cellules souches est choisie de façon que la concentration de DMSO nécessaire dans la suspension finale soit obtenue. 8 ml de CryoSure-DEX40 contiennent 4 ml de DMSO ($\pm 4,4$ g DMSO). La densité de DMSO est $1,1 \text{ g/cm}^3$ à l'état normal. En accord avec le protocole de Rubinstein et al 5 ml de CryoSure-DEX40 doivent être ajoutés à 20 ml du concentré de sang de cordon ombilical. Par conséquence dans la suspension finale prête à congeler il résultent 2,5 ml de DMSO, qui mènent à une concentration de DMSO dans la suspension finale de 10 % (1).

2. Prélèvement de CryoSure-DEX40 dans le flacon et préparation de la solution cryoprotectrice

Avant de l'ajouter CryoSure-DEX40 faut être réfrigéré à 2°C . La quantité de CryoSure-DEX40 nécessaire d'obtenir la concentration visée dans le volume final destiné à être congelé est prélevée du flacon volumétriquement.

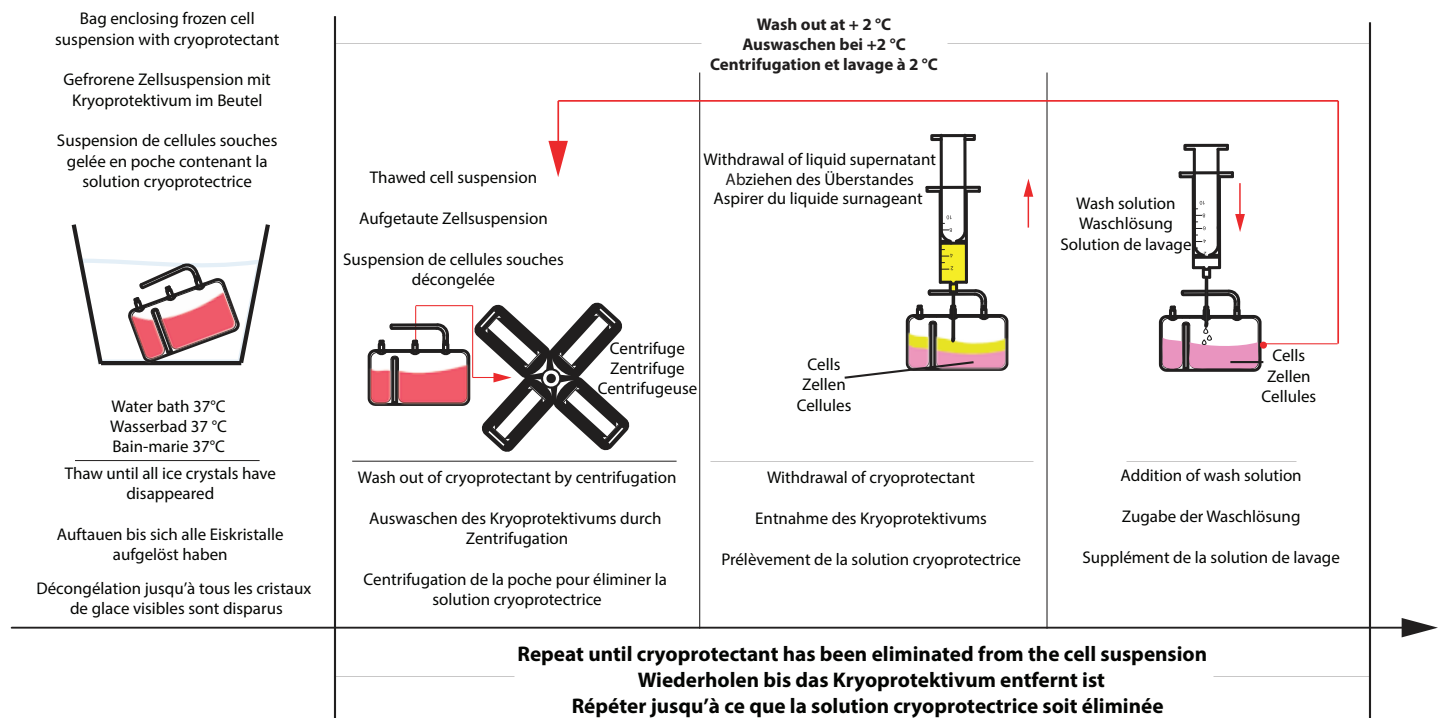
3. Supplément de CryoSure-DEX40 à la suspension de cellules souches

Avant d'ajouter CryoSure-DEX40 la suspension de cellules souches est placée sur un lit de glace pour la réfrigérer à 2°C . Puis le CryoSure-DEX40 réfrigéré est ajouté volumétriquement à la suspension de cellules souches d'une vitesse constante pendant une durée de 15 minutes jusqu'à ce que le volume final destiné à être congelé soit obtenu. De préférence une pompe à seringue calibrée est employée pour ce supplément (1). Le supplément égal retardé de CryoSure-DEX40 contenant du DMSO assure la compatibilité osmotique du DMSO hyperosmolaire avec les cellules de la suspension de destination. Pendant le supplément la suspension de cellules est constamment panachée d'une façon régulière pour obtenir une diffusion égale dans la suspension de destination (1).

4. Commencement du processus de congélation

Après avoir terminé le supplément de CryoSure-DEX40 il faut immédiatement commencer avec le processus de congélation de la suspension de cellules souches. Jusqu'au début du processus la température de la suspension doit être tenue constamment à 2°C . Pour la congélation des procédures différentes sont décrites dans la littérature scientifique. Quand le DMSO est employé comme agent cryoprotecteur un degré Celsius par minute est indiqué dans la littérature comme vitesse de congélation à succès pour les cellules souches hématopoïétiques jusqu'à ce que la température de stockage finale soit obtenue (16).

II Withdrawal of cryoprotectant from the stem cell suspension after thawing Entfernen des Kryoprotektivums aus der Stammzellsuspension nach dem Auftauen Élimination de la solution cryoprotectrice de la suspension de cellules souches après la décongélation



EN II Withdrawal of cryoprotectant from the stem cell suspension after thawing

Immediately after the completed thawing process the cryoprotective solution must be washed out of the stem cell suspension. The washing process is executed in several washing steps consisting of centrifugation, withdrawal of liquid supernatant and resuspension of the cells using an appropriate wash solution. The stem cell suspension has to be kept cool at 2 °C during the washing process until the quantitative elimination of the cryoprotectant from the suspension has been concluded. Consequently the washing process has to be performed by employing a refrigerated centrifuge. The user is responsible for validating the washing process. Several methods are available for performing the washing process within a closed system (19-25).

DE II Entfernen des Kryoprotektivums aus der Stammzellsuspension nach dem Auftauen

Unmittelbar nach Ende des Auftauprozesses muss die kryoprotektive Lösung ausgewaschen werden. Der Auswaschprozess erfolgt in mehreren Waschschritten mittels Zentrifugation, Entfernen des flüssigen Überstandes und Resuspension der Zellen mit einer geeigneten Waschflüssigkeit. Während des Auswaschprozesses bis zum quantitativen Entfernen der kryoprotektiven Lösung aus dem Stammzellpräparat ist dieses bei +2 °C zu temperieren. Das Auswaschen muss demnach mithilfe einer Kühlzentrifuge erfolgen. Die Validierung des Auswaschprozesses obliegt dem Anwender. Für das Auswaschen im geschlossenen System existieren mehrere Verfahren (19-25).

F II Élimination de la solution cryoprotectrice de la suspension de cellules souches après la décongélation

Immédiatement après que la décongélation soit terminée la solution cryoprotectrice faut être éliminée de la suspension de cellules souches. Le processus d'élimination se passe en plusieurs pas qui se subdivisent en centrifugation, prélèvement du liquide surnageant et resuspension du sédiment dans une solution de lavage appropriée. Pendant ce processus de centrifugation et lavage jusqu'à l'élimination quantitative de la solution cryoprotectrice la suspension de cellules souches doit être réfrigérée à 2 °C. Par conséquent l'élimination doit être effectuée employant une centrifugeuse réfrigérée. L'utilisateur est responsable de valider le processus d'élimination. Plusieurs procédures existent pour l'élimination de la solution cryoprotectrice dans un système fermé (19-25).

Sources/Quellen/Bibliographie

- 1) Rubinstein, P.; Dobrila, L.; Rosenfield, R.E.; Adamson, J.W.; Migliaccio, G.; Migliaccio, A.R.; Taylor, P.E.; Stevens, C.E. : "Processing and cryopreservation of placental / umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution" . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 , 10119-10122 (1995)
- 2) Farrant 1969, Nature, 11755
- 3) Mazur 1970, Science 168, 939-949
- 4) Leibo 1977, Ciba Foundation Symposium No.52, Amsterdam S. 69-96
- 5) Merryman et al 1977 Cryobiology 14, 287-302).
- 6) Whittingham 1981, Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart, S. 21-22
- 7) Lovelock 1953, Biochim. Biophys. Acta 10, 414-426
- 8) Merryman 1974, An. Rev. Of Biophys. And Bioengineering, Band 3 Paolo Alto, S.341-363
- 9) Goris A: '[Test of the toxicity of dimethyl sulfoxide (D.M.S.O.) on carrot tissue cultured in vitro]', Ann Pharm Fr. 1966 Dec;24(12):781-4
- 10) Basch, H., and Gadebusch, H.H. In vitro antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide. Appl. Microbiol. 16: 1953-1954 (1968).
- 11) Chang CY, Simon E: 'The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cellular systems,' Proc Soc Exp Biol Med. 1968 May;128(1):60-6
- 12) Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P: 'Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures,' Bilo. Pharm. Bull. 25(12) 1600-1603 (2002)
- 13) Fahy GM: 'The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology,' Cryobiology 1986 Feb;23(1):1-13
- 14) Gurtuvenko AA, Anwar J: 'Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide,' J Phys Chem B. 2007 Sep 6;111(35):10453-60
- 15) Yang H, Zhao H, Acker JP, Liu JZ, Akabutu J, McGann LE: 'Effect of dimethyl sulfoxide on post-thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood,' Cryobiology 2005 Oct;51(2):165-75
- 16) Hunt CJ, Armitage SE, Pegg DE: 'Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34(+) cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing,' Cryobiology. 2003 Feb;46(1):76-87
- 17) Rowley S.D., Anderson G.L.: 'Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells' Bone Marrow Transplant.11, 389-393 (1993)
- 18) Branch, D.R.; Calderwood, S.; Cecutti, M.A.; Herst, R.; Solh, H. : "Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity" . Transfusion 34, Nr.10 , 887-890 (1994)
- 19) Calmels B, Houzé P, Hengesse JC, Ducrot T, Malenfant C, Chabannon C.: , Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing,' Bone Marrow Transplant. 2003 May;31(9):823-8.
- 20) Rodríguez L, Velasco B, García J, Martín-Henao GA.: 'Evaluation of an automated cell processing device to reduce the dimethyl sulfoxide from hematopoietic grafts after thawing,' Transfusion. 2005 Aug;45(8):1391-7.
- 21) Foïs E, Desmartin M, Benhamida S, Xavier F, Vanneaux V, Rea D, Femand JP, Arnulf B, Mounier N, Ertault M, Lotz JP, Galicier L, Raffoux E, Benbunan M, Marolleau JP, Larghero J.: 'Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations,' Bone Marrow Transplant. 2007 Nov;40(9):831-5. Epub 2007 Aug 27.
- 22) Laroche V, McKenna DH, Moroff G, Schierman T, Kadidlo D, McCullough J.: , Cell loss and recovery in umbilical cord blood processing: a comparison of postthaw and postwash samples,' Transfusion. 2005 Dec;45(12):1909-16.
- 23) Lemarie C, Calmels B, Malenfant C, Arneodo V, Blaise D, Viret F, Bouabdallah R, Ladaïque P, Viens P, Chabannon C.: 'Clinical experience with the delivery of thawed and washed autologous blood cells, with an automated closed fluid management device: CytoMate,' Transfusion. 2005 May;45(5):737-42.
- 24) Nagamura-Inoue T, Shioya M, Sugo M, Cui Y, Takahashi A, Tomita S, Zheng Y, Takada K, Kodo H, Asano S, Takahashi TA.: 'Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank,' Transfusion. 2003 Sep;43(9):1285-95.
- 25) Perotti CG, Del Fante C, Viarengo G, Papa P, Rocchi L, Bergamaschi P, Bellotti L, Marchesi A, Salvaneschi L.: 'A new automated cell washer device for thawed cord blood units,' Transfusion. 2004 Jun;44(6):900-6.

L-09-041-23-2-07-email (last revision: 05/2020)