



Monoklonale Antikörper: *In vitro*-Produktionsmethoden im Vergleich

René W. Fischer und Philippe C. Ferber

Laboratorium für Biochemie 1
ETH Zürich
Universitätsstrasse 16, 8092 Zürich

Zusammenfassung

Die Vermehrung Antikörper produzierender Hybridomzellen in der Bauchhöhle der Maus, mit anschliessender Gewinnung der Aszitesflüssigkeit, ist ein einfaches Verfahren zur Produktion monoklonaler Antikörper. Aufgrund der starken Belastung der Maus, wird dieses Verfahren vom Gesetzgeber nur noch solange geduldet, bis alternative Methoden entwickelt und validiert sind. Zur Zeit bieten sich verschiedene Zellkultursysteme als Alternativen an: Statische Kultur, gerührte und gerollte Kulturen (Spin-/ Roller- Flaschen), sowie Kulturen in Bioreaktoren (automatisierte Zellkultur Geräte). Die vorliegende Arbeit untersucht diese Methoden auf ihre Tauglichkeit im Forschungslabor. Die Resultate zeigen deutlich, dass für alle benötigten Antikörpermengen ein geeignetes Verfahren zur Verfügung steht und somit auf die "Aszites-Maus" verzichtet werden kann.

Summary: Monoclonal antibodies: Comparative methods for *in vitro* production

The growth of antibody producing hybridoma in the abdominal cavity of the mouse with subsequent harvesting of the ascites fluid is a simple method for the production of monoclonal antibodies. However, due to the massiv painful stress of the animal, this method is no longer tolerated by the legislator. In search of alternative methods the scientist has the choice between different techniques: Static tissue culture, spin- or roller-cultures as well as the production in bioreactors (automated cell culture devices). The presented work investigates the different methods and describes their applicability in a research lab. The results clearly show that for any desired amount of antibodies a production technique is available which allows the omission of the use of the "ascites-mouse".

Einleitung

Die biologische Grundlagenforschung wäre heute ohne die Anwendung von Antikörpern kaum denkbar. Antikörper werden u. a. zur Quantifizierung (ELISA, RIA), Lokalisierung (Gewebeschnitte) und Reinigung (Affinitätschromatographie) sowohl charakterisierter als auch neuentdeckter Biomoleküle eingesetzt. Der Forscher hat die Möglichkeit, zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern zu wählen. Die polyklonalen Antikörper (pAK) können schon einen Monat nach der ersten Immunisierung des Tieres getestet und eingesetzt werden. Der zeitliche Aufwand für die Gewinnung monoklonaler Antikörper (mAK) ist um einen Faktor 3 -5 grösser.



Ein Artikel über die Gewinnung polyklonaler Antikörpern in Aves und Mammalia erscheint ebenfalls in dieser Ausgabe von Altex (1). Während bei den polyklonalen Antikörpern die Produktion von *einem* Spendertier abhängt und mit dessen Ableben unwiderruflich verloren geht, können mit den "unsterblichen" Hybridomzellen zeitlich unbegrenzt monoklonale Antikörper produziert werden (2). Die Immunisierung des Tiers (Maus, Ratte), die Fusion der Milzzellen (sie geben den Hybridomzellen die Information für die Antikörperbildung) mit den Myelomazellen (Krebszellen, welche die Hybridomzellen "unsterblich" machen) sowie die Aufzucht der dabei gebildeten, mAK-produzierenden Hybridomzellen, sind in den meisten Forschungslaboratorien schon Routine. Die heute zur Verfügung stehende Analytik erlaubt dem Anwender, mit wenig Material eine frühe Selektion der Klone vorzunehmen. Schon kurz nach der erfolgreichen Fusion können die ersten wichtigen Charakterisierungen der mAK durchgeführt werden. Weniger als 100 µl des Zellkulturüberstandes, wie er in der 96-Lochplatte anfällt, genügen zur Spezifitäts- und der Ig-subklassenbestimmung (inkl. Typisierung der L- und H-Ketten), ferner kann mit derselben Probe noch der isoelektrische Punkt des Immunglobulins bestimmt werden. Mit diesen Angaben kann man sich bereits eine Strategie zur Reinigung der Antikörper zurechtlegen (3). Abhängig von der geplanten Anwendung stellt sich zu diesem Zeitpunkt die Frage nach der geeigneten Produktionsmethode für grössere Antikörpermengen. Bis heute bediente man sich dafür häufig der "Aszites-Maus". Bei diesem, von Tierschützern kritisierten Verfahren, werden der Maus die mAK-produzierenden Hybridomzellen nach vorangegangener Pristanapplikation in die Bauchhöhle gespritzt. Nachdem sich zuerst aufgrund der Pristan- und Hybridomzellinjektion eine Peritonitis und etwas später der mAK produzierende Tumor entwickelt haben, kann die mAK enthaltende Aszitesflüssigkeit aus der Bauchhöhle entnommen werden (4). Diese Methode hat neben den Vorteilen der einfachen Handhabung, den niedrigen Investitionskosten sowie der hohen Antikörperkonzentration u.a. zwei gravierende Nachteile:

1. Die Tiere sind während des Versuchs einer grossen Schmerzbelastung ausgesetzt.
2. Der Erfolg ist nicht garantiert (häufig werden nur solide Tumore beobachtet, welche sehr wenig Aszitesflüssigkeit und somit wenig nutzbare Antikörper produzieren).

Es ist daher naheliegend, dass heute versucht wird, die *nota bene in vitro* entwickelten Hybridomas, mit geeigneten einfachen Techniken auch *in vitro* zu vermehren und die gesuchten Antikörper in den benötigten Mengen ohne Aszitesmäuse zu produzieren.



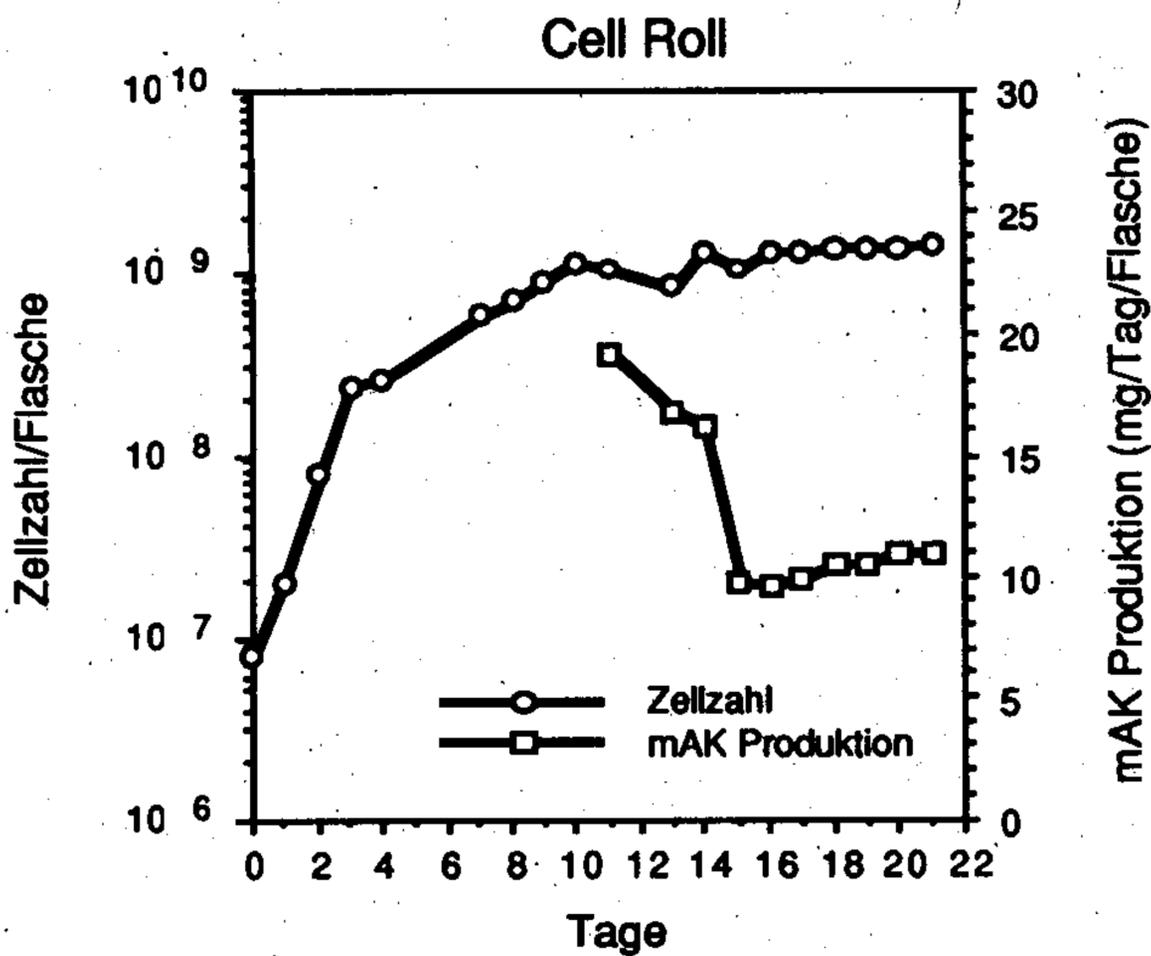
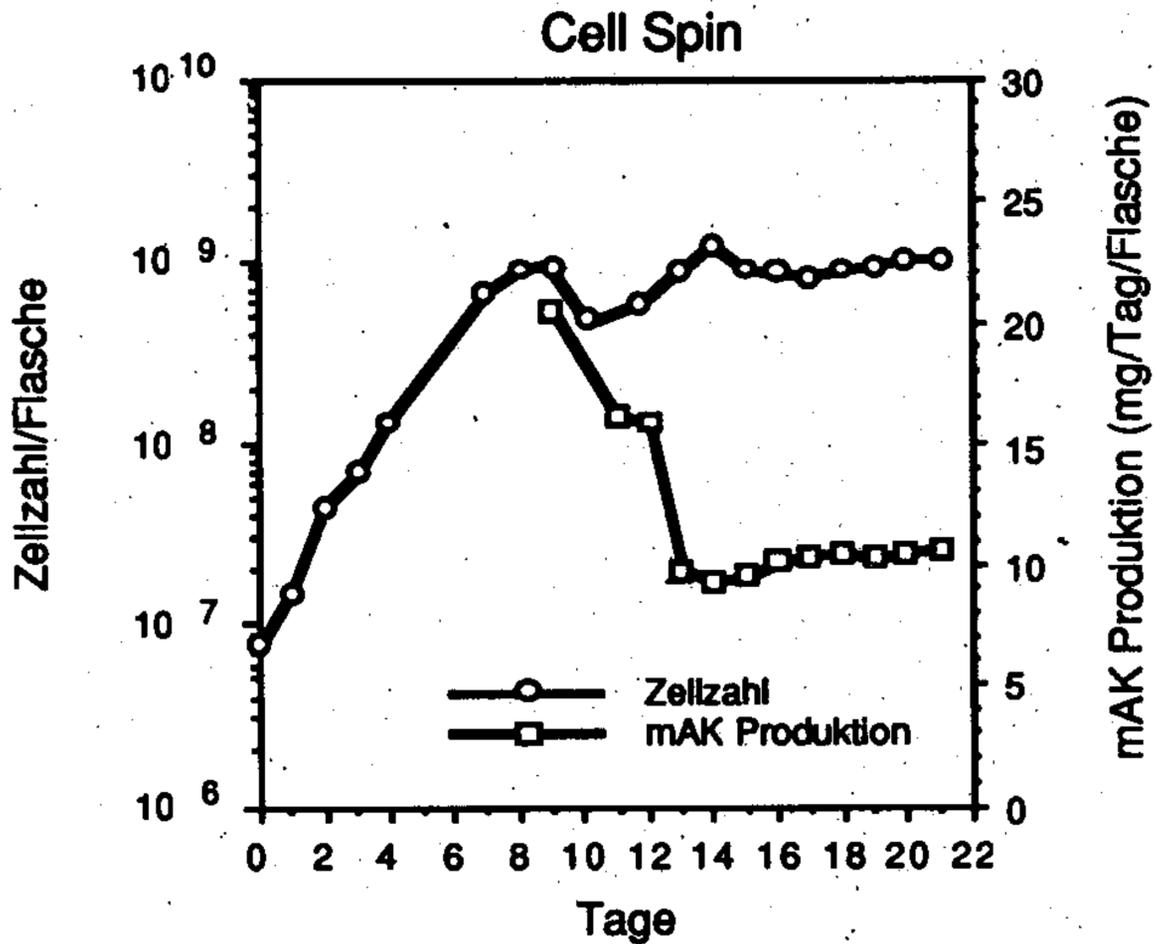
Material und Methoden

Als Zellkulturmedium wurde in allen Versuchen das mit 36 mM Natriumhydrogencarbonat und 25 mM HEPES gepufferte "Iscove's modified Dulbecco Medium" (IMDM) eingesetzt. Das Medium wurde nach dem Auflösen des Pulvers (Gibco, Basel; Tecnomara, Wallisellen) in Wasser direkt in die, für die verschiedenen Anwendungen geeigneten Flaschen steril filtriert. Alle Zellkulturflaschen, Schalen und Pipetten (Falcon und Costar) wurden durch Winiger AG, Wohlen bezogen. Bei den statischen Zellkulturen in den 162 cm² T-Flaschen wurden täglich 30-50 ml Medium ersetzt, nach ca zwei Wochen wurden die Zellen zudem auf neue Kulturflaschen verteilt. Für die Roll- und Rührflaschenkulturen wurden die "Cell-Roll" bzw. "Cell-Spin" Einheiten der Firma Tecnomara, Wallisellen eingesetzt.

Die Bedingungen der Kulturen in den Bioreaktoren wurden im wesentlichen den Bedienungsanleitungen der Hersteller entnommen. Im *Acusyst R* von Endotronics (von der Firma Tecnomara, Wallisellen, für diesen Test freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurde eine 1,1 m² Hollowfiber Kartusche mit einer Ausschlussgrösse von 30 kD eingesetzt. Im *Opticell R 5200* von Charles River (Digitana AG, Horgen) kam der Keramikreaktor S52 für nicht-adhärente Zellen zum Einsatz. In beiden Systemen wurde darauf geachtet, dass die Glukosekonzentration im Medium nicht unter 1.5 g/l sank und der pH-Wert immer zwischen 6.9 und 7.2 lag. Die Erntemengen betragen im Hollowfibersystem 150 ml/Tag, während mit dem Opticell 1 l/Tag geerntet wurde. Der totale Verbrauch an Medium lag bei beiden Systemen bei 1 l/Tag. Die IgG Konzentration in den Medien wurde mit dem "Pro-Ana-mab" Kit der Firma Hyclone, Lund, Schweden nach den Instruktionen des Herstellers bestimmt. Als Standards wurden die mitgelieferten IgG-Proben verwendet.

Die Kostenberechnungen zum Vergleich der verschiedenen Produktionsmethoden berücksichtigen ausschliesslich die Kosten für das Verbrauchsmaterial (Medium, FCS, Gase, Kartuschen und Kleinmaterial). Investitionen, Abschreibungen, Saläre sowie Kosten für Energie wurden nicht miteinbezogen.

Beim Cell-Spin und Cell-Roll Versuch wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis Zellzahl/IgG-Produktion konstant gehalten werden konnte. Die mit 500 ml Flaschen ermittelten Werte können aus den nachfolgenden zwei Grafiken entnommen werden (Fig.1 und 2). Die Resultate wurden alle mit derselben Zelllinie sowie mit demselben Medium erarbeitet. Damit die Daten vergleichbar sind, wurden die zeitlichen und finanziellen Aufwendungen der verschiedenen klassischen Kultursysteme auf die für die Bioreaktoren typische Produktionsmenge von 160 mg IgG pro Tag hochgerechnet.



Figuren 1 und 2.

Vergleich von Cell Roll und Cell Spin Kulturen.

Die 500 ml Flaschen wurden mit je 100 ml Medium (10^5 Zellen/ml) angesetzt. Während der Aufzuchtphase von Tag 0 bis 9 bzw. 11. wurden die Flaschen lediglich mit frischem Medium aufgefüllt. Nachdem die Flaschen auf ihren Nennwert gefüllt waren, wurde mit dem täglichen Ernten begonnen. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellzahl (2×10^6 Zellen/ml) konstant gehalten werden konnte.

Resultate und Diskussion

Bei den Bioreaktoren gelangen heute zwei verschiedene Systeme zur Anwendung: Das Zellkultursystem in Hollow Fiber Kartuschen oder Keramikreaktoren. Die zwei Funktionsprinzipien sind im folgenden kurz erläutert. Beim Keramikreaktor - er ist in seiner Beschaffenheit mit einem Autokatalysator zu vergleichen - nisten sich die Zellen auf der grossen, porösen Oberfläche ein. Die Versorgung mit den Nährstoffen geschieht durch das im Reaktor zirkulierende Nährmedium. Die von den Zellen sezernierten Produkte gelangen ebenfalls in das zirkulierende Medium und können in der Folge daraus isoliert werden. Im Gegensatz zu diesem Prinzip gibt es in der Hollow Fiber Kartusche zwei Kreisläufe, getrennt durch eine Membran mit wählbarer Porengrösse. Auf der einen, der extrakapillären Seite werden die Zellen angesiedelt, auf der anderen, intrakapillären Seite zirkuliert das Medium, welches die Zellen mit den niedermolekularen Nährstoffen (Glukose, Aminosäuren, Vitamine und Salze), durch die Membran hindurch versorgt. Zusammengefasst ergeben sich für den Praktiker im wesentlichen folgende Unterschiede:

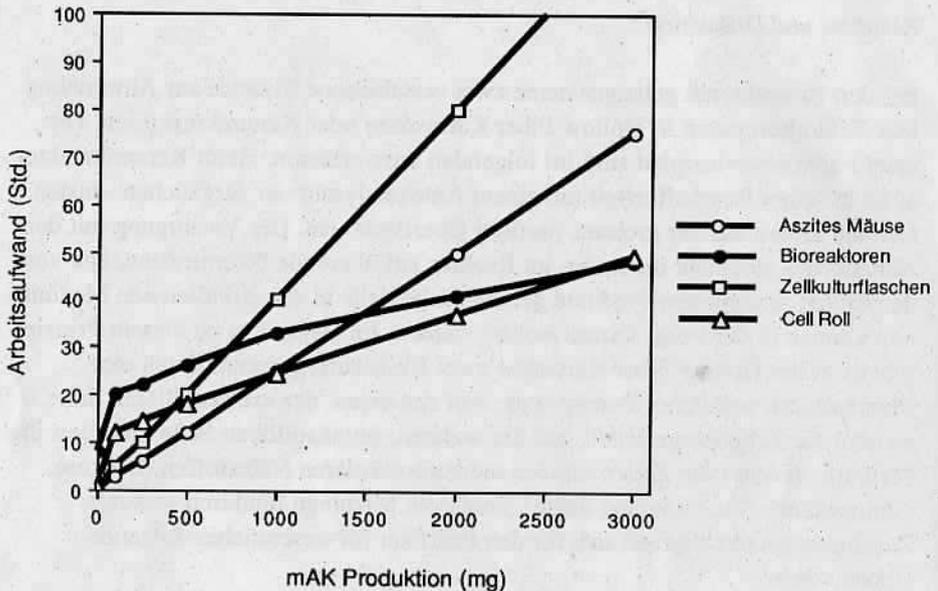
Keramikreaktor:

- Der Zusatz von Wachstumsfaktoren (FCS) kann, sobald sich die Zellen in der stationären Phase befinden, drastisch reduziert werden. Dieser Umstand kann sich besonders bei Langzeitkulturen kostensenkend auswirken.
- Geringe Konzentration der Antikörper (100 - 200 $\mu\text{g/ml}$ mAK)
- Der Reaktor ist wiederverwendbar.
- Da der Keramikreaktor "on line" mit Nährstoffen versorgt wird, ist ein schnelles Initialwachstum der Zellen festzustellen.

Hollow Fiber Kartusche:

- Aufgrund des relativ kleinen extrakapillären Volumens können den Zellen Wachstumsfaktoren kostengünstig, auch in hohen Konzentrationen, angeboten werden.
- Die Konzentration an Antikörper ist gross ($> 900 \mu\text{g/ml}$ mAK)
- Die Kartusche ist für einmaligen Gebrauch konzipiert.
- Die Diffusionsbarriere, welche je nach Porengrösse der Membrane verschieden gross ist, verzögert das Wachstum der Zellen, was sich in einer "Lagphase" von einigen Tagen widerspiegelt.

Die täglichen Produktionsmengen, der zeitliche und finanzielle Aufwand für den Unterhalt der beiden Systeme unterscheiden sich nur unwesentlich, es wurde deshalb auf eine separate Aufzeichnung der Resultate verzichtet. In den Resultaten erscheinen denn auch nur die Werte für "Bioreaktoren".



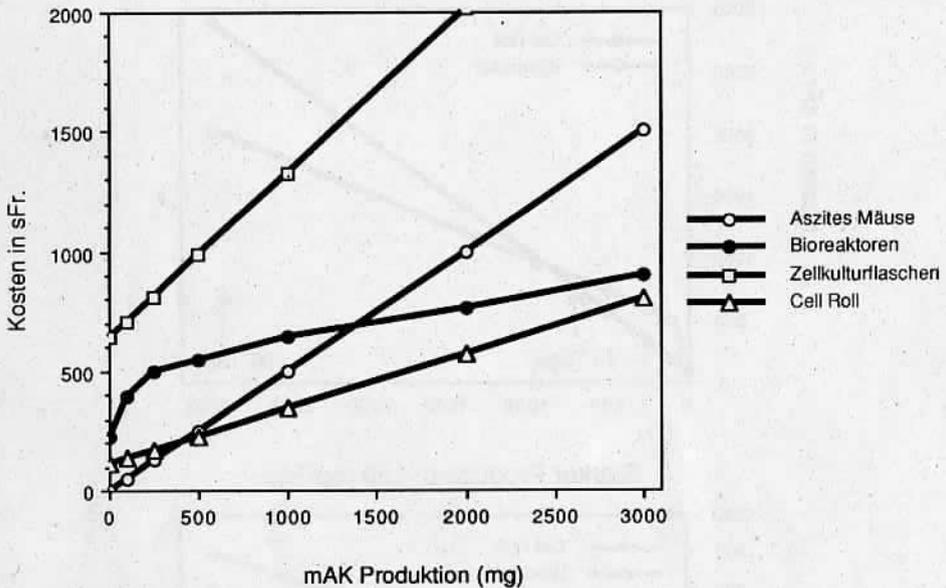
Figur 3.

Vergleich des Arbeitsaufwandes der verschiedenen mAK-Produktionsmethoden.

Die Werte der Aszites Mäuse und die der statischen Zellkultur wurden in kleinen Ansätzen ermittelt und auf die dargestellten Produktionsmengen hochgerechnet.

In Figur 3 ist der zeitliche, in Figur 4 der finanzielle Aufwand für die Produktion monoklonaler Antikörper mit den drei alternativen Produktionsmethoden, statische, gerührte/gerollte Zellkultur und Kultur in Bioreaktoren, dargestellt. Als Vergleich sind die hochgerechneten Werte für die Aszitesmäuse aufgezeichnet. Die ermittelten Werte der Aszitesmäuse und der statischen Zellkultur ergeben Geraden, die linear mit der produzierten mAK Menge ansteigen. Die Kurve des Bioreaktors zeigt initial einen hohen Wert, welcher auf die aufwendige Bereitstellung einerseits und der nicht-produktiven Zeit zwischen dem Inokulum und dem Erreichen der produktiven, stationären Phase andererseits zurückzuführen ist. Dieser Umstand ist, wenn auch weniger ausgeprägt, bei den Rühr-/Rollkulturen festzustellen, schlagen sich da jedoch nur die Aufwendungen während der unproduktiven Startphase bis zum Erreichen der optimalen Zelldichte nieder.

Bei der Darstellung der Kosten (Figur 4) erhalten wir ein ähnliches Bild, dabei fallen die hohen Initialkosten des Bioreaktors (Kartusche) sowie die Kosten für die Plastikwaren der statischen Kultur auf. Sind die beiden Systeme einmal im



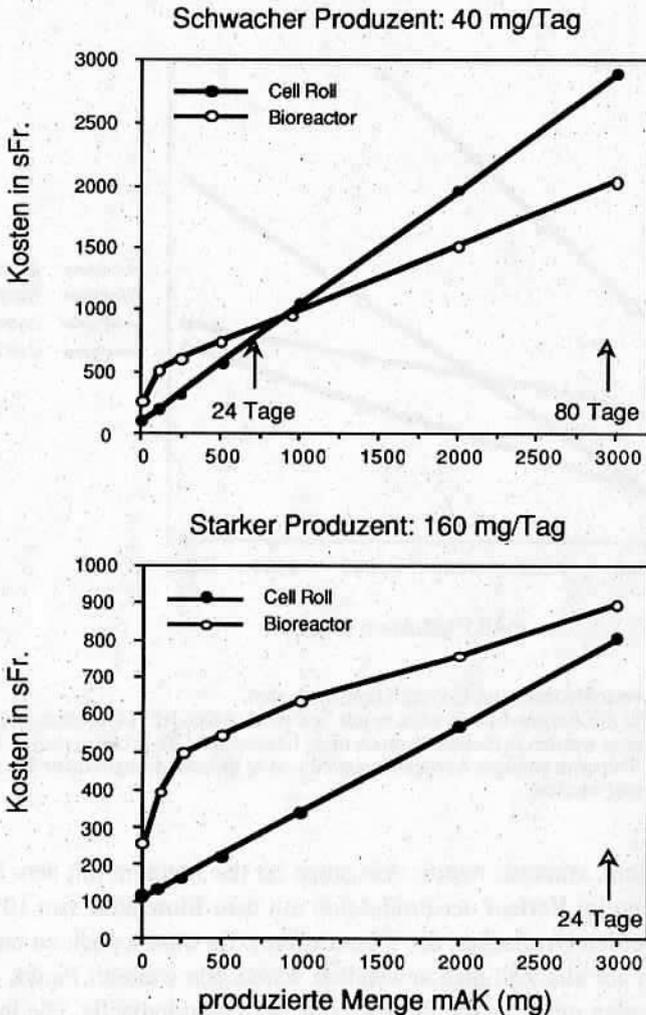
Figur 4.

Kostenvergleich der verschiedenen mAK-Produktionsmethoden.

Die Aufwendungen für die Aszites-Mäuse wurden mit "gut produzierenden" Hybridomzellen ermittelt, solide Tumoren wurden in diesem Versuch nicht beobachtet. Oft produzieren die Mäuse aufgrund der soliden Tumoren weniger Aszitesflüssigkeit und es müssen deshalb mehr Tiere eingesetzt und berechnet werden.

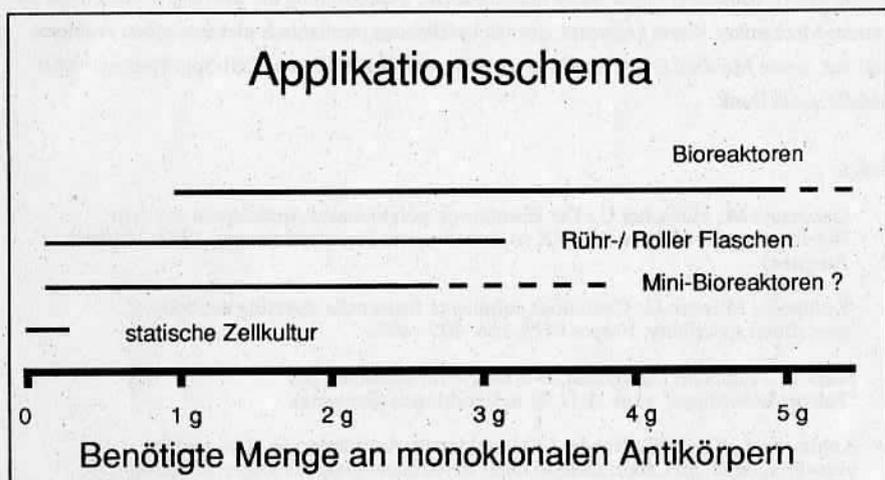
produktiven Stadium, kommen nur die Ausgaben für das Medium mit dem FCS dazu, letzteres kann im Verlauf der Produktion mit dem Bioreaktor von 10% auf 0.1% reduziert werden (Abflachen der Kostenkurve). Es wäre jedoch zu einfach, wenn diese Daten auf alle Zelllinien anwendbar wären. Ein weiterer Punkt, der berücksichtigt werden muss, ist die Produktivität der Hybridomzelle. Die in den Figuren 3 und 4 dargestellten Resultate wurden mit gut produzierenden Hybridomzellen (160 mg/Tag) erarbeitet. Den Grafiken kann entnommen werden, dass bei einer Produktion von etwa 3 g die Rühr-/Rollkulturen und die der Bioreaktoren einen vergleichbaren finanziellen und zeitlichen Aufwand benötigen. In Figur 5 werden diese Daten mit einer schwach produzierenden Zelle

verglichen. Es ist gut ersichtlich, dass sich bei Langzeitkulturen der Schnittpunkt der beiden Kurven zugunsten der Bioreaktoren verschiebt.



Figur 5. Kostenvergleich in Abhängigkeit der mAK-Produktionsraten verschiedener Hybridomzellen. Der zeitliche Verlauf der Produktion ist mit Pfeilen in den Grafiken eingezeichnet. Die Kosten pro Produktionstag sind für starke und schwache Produzenten mit der jeweiligen Methode konstant. (Der Mediumverbrauch ist von der Zellzahl und nicht von der Produktivität abhängig). Je nach gewünschter Antikörpermenge und der Produktionsrate kann die entsprechende Methode gewählt werden.

Mit diesen Daten lässt sich zusammenfassend folgendes Anwendungsschema der verschiedenen Produktionsmethoden aufzeichnen:



Bei den erwähnten Mini-Bioreaktoren handelt es sich um neuentwickelte Geräte, welche die Vermehrung von drei und mehr verschiedenen Klonen gleichzeitig erlauben. Diese Reaktoren werden zur Zeit in unserem Labor getestet. Alle diese Methoden zusammen decken den ganzen Produktionsbereich sehr gut ab. Für die ersten Tests und die Charakterisierung der Antikörper genügen die in statischer Kultur gewonnenen Mengen durchaus. Für die, während der Validierungsphase benötigten Mengen, bieten sich die Mini-Bioreaktoren und die Zell-Roll bzw. Zell-Spin Geräte an. Grosse Mengen werden vorzugsweise in den bewährten Bioreaktoren produziert.

Schlussfolgerung

Der Anwender von monoklonalen Antikörpern kann heute, entsprechend seiner Laborausstattung und seinen Fähigkeiten, zwischen verschiedenen *in vitro* Methoden zur Antikörperproduktion wählen. Alle diese Methoden sind, innerhalb ihren Grenzen, gut geeignet und erlauben den Verzicht auf den Einsatz der "Aszites-Maus".



Verdankungen

Die Autoren verdanken an dieser Stelle die finanzielle Unterstützung der Stiftung "Finanz-Pool 3R". Unserem Mechaniker Anton Lehmann, der alle anfallenden mechanisch-elektronischen Probleme gelöst hat, sowie Manfred Giger für die Erarbeitung der Cell-Roll- und Cell-Spin-Daten gebührt ebenfalls unser Dank.

Literatur

- (1) Gassmann M.; Hübscher U.: Der Einsatz von polyklonalen Antikörpern aus dem Eigelb geimpfter Hühner. ALTEX (Alternativen zu Tierexperimenten) 1992, 16 (diese Ausgabe)
- (2) Köhler G.; Milstein C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, 256: 495 - 497.
- (3) Marx U., Humboldt Universität, D-1000 Berlin anlässlich des "Falcon-Workshops" vom 21.11.91 in Egerkingen (Schweiz)
- (4) Kuhlmann I., Kurth W., Ruhdel I.: Monoklonale Antikörper: In vivo- und in vitro-Produktion im Labormassstab unter Berücksichtigung tierschutzrechtlicher Aspekte. ALTEX (Alternativen zu Tierexperimenten) 1989, 11: 12 - 26.