Monoklonale Antikörper: In vivo- und in vitro-Produktion im Labormaßstab unter Berücksichtigung tierschutzrechtlicher Aspekte

Ingrid KUHLMANN, Waltraud KURTH, Irmela RUHDEL
Tierforschungsanlage, Universität Konstanz, D-7750 Konstanz

Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper sind heute in der medizinischen und biologischen Forschung ein wertvolles Instrumentarium, das zur Identifizierung, Charakterisierung und Reinigung von medizinisch und biologisch bedeutsamen Substanzen eingesetzt wird. Durch ihre große Spezifität finden monoklonale Antikörper zunehmend Anwendung in der Diagnostik und Therapie von Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen. Für diese Anwendungsbereiche werden große Mengen monoklonaler Antikörper benötigt, die eine Massenproduktion (g - kg Bereich) erforderlich machen. Hierzu wurden zahlreiche Produktionssysteme und Optimierungsmöglichkeiten beschrieben. Dagegen wird die Produktion monoklonaler Antikörper im Labormaßstab (mg Bereich), wie sie vor allem an Universitäten und anderen Forschungseinrichtungen erfolgt, heute noch weitgehend in der Aszitesmaus vorgenommen. In diesem Artikel werden unsere eigenen Erfahrungen und Ergebnisse mit der in vitro-Produktion im mg-Bereich dargestellt. Am Beispiel des deutschen Tierschutzgesetzes vom 22.8.1986 werden tierschutzrechtliche Aspekte der Produktion monoklonaler Antikörper angesprochen. Außerdem werden die gesetzlichen Regelungen in der Schweiz und in Holland aufgezeigt.

Summary: Monoclonal antibodies: in vivo- and in vitro-production in laboratory scale with consideration of the legal aspects of animal protection

Monoclonal antibodies are valuable tools in medical and biological research which can be used for identifying, characterizing and purifying medically and biologically important substances. Due to their high specificity monoclonal antibodies are more and more used

in the diagnosis and therapy of infectious diseases and tumor illnesses. Large amounts of antibodies are needed for use in these areas and this necessitates mass production (g - kg range). Many production systems and possibilities for optimizing mass production have been described. In contrast, at universities and other research institutions the production of monoclonal antibodies in laboratory scale (mg range) is still carried out mostly in the ascites mouse. This article described our own experiences and results with the in vitro production in mg range. Using the German animal protection law (22.8.1986) as an example the legal aspects of animal protection in the production of monoclonal antibodies are discussed. In addition the legal regulations in Switzerland and the Netherlands are presented.

In vivo Produktion monoklonaler Antikörper

Köhler und Milstein gelang 1975 die Herstellung monoklonaler Antikörper (9), wofür sie 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Die Produktion monoklonaler Antikörper wird vorwiegend in der "Aszitesmaus" durchgeführt. Hierzu werden den Mäusen Hybridomzellen (Antikörper - produzierende Tumorzellen) in die Bauchhöhle gespritzt, nachdem sie 14 Tage zuvor mit einer intraperitonealen (i.p.) Injektion von Pristan (2-,6-,10-,14-Tetramethylpentadecan) vorbehandelt worden waren (1,8,22). Durch die Pristaninjektion kommt es zu zwei gewünschten Reaktionen bei der Maus, die für die in vivo-Produktion monoklonaler Antikörper wichtig sind. Erstens wird die Immunabwehr supprimiert, so daß das Wachstum der Hybridomzellen in der Bauchhöhle nicht stark beeinträchtigt wird. Zweitens entsteht durch die toxische Reizung der Bauchhaut und durch das Wachstum der Hybridomzellen in der Bauchhöhle eine Peritonitis mit Absonderung seröser Flüssigkeit (Aszitesflüßigkeit). Die monoklonalen Antikörper werden von den in der Bauchhöhle wachsenden Hybridomzellen in die Aszitesflüssigkeit sezerniert, aus der sie dann "geerntet" und gereinigt werden können.

Durch die Injektion von Pristan und Hybridomzellen in die Bauchhöhle der Maus kommt es - außer bei der Aszitesproduktion - zur Bildung von multiplen, infiltrativ wachsenden Tumoren (12, 15, eigene Erfahrungen). Die in vivo Vermehrung monoklonaler Antikörper in der

Maus durch eine i.p. Injektion von Pristan und Hybridomzellen ist somit eine tumoröse Erkrankung, die für das Tier mit Schmerzen und Leiden verbunden ist. Aus Tierschutzgründen ist die Entwicklung und Etablierung einer in vitro-Methode zur Vermehrung monoklonaler Antikörper im Labormaßstab dringend geboten.

In vitro Produktion monoklonaler Antikörper

Bereits 1975 wiesen Köhler und Milstein auf die Möglichkeit hin, monoklonale Antikörper in Zellkultur herzustellen (9). Seither wurde die in vitro-Herstellung monoklonaler Antikörper in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben (2,3,4,5,6,7,11,14,15,17,18,19,21). Allerdings schwanken die Angaben zur Ausbeute an monoklonalen Antikörpern in der Zellkultur zwischen einem Hundertstel bis Zweitausendstel des Wertes der für die Maus angegeben wird (Tab.1). Die große Variationsbreite in der Effizienz der Zellkulturmethode kommt durch viele Faktoren zustande, die dieses Produktionsverfahren beeinflussen können. Außerdem ist der übliche Vergleich des Antikörpergehalts in 1 ml Aszitesflüssigkeit mit dem in 1 ml Zellkulturüberstand eine stark vereinfachte Darstellung, die nicht berücksichtigt, daß von letzterem eine größere Menge verfügbar ist, die leicht eingeengt werden kann. In der Regel werden wenig aufwendige, wirtschaftliche und effektive Zellkulturverfahren zur Produktion monoklonaler Antikörper im Labormaßstab benötigt. Hier kommt vor allem die Spinner- und die Rollkultur in Frage.

Eigene Erfahrungen zur in vivo- und in vitro-Produktion monoklonaler Antikörper im Labormaßstab

Im Neubau der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz wurden 1985 fünf ursprünglich geplante Tierräume in Zellkulturlabors umgerüstet. Diese Labors (mit der entsprechenden Infrastruktur) stehen den Arbeitsgruppen der Fakultät für Biologie zur Produktion monoklonaler Antikörper zur Verfügung. Diese etwas ungewöhnliche Zusammenarbeit von Mitarbeitern aus verschiedenen Forschungsge-

Tab. 1: Ausbeute an monoklonalen Antikörpern im Labormaßstab

in vivo "Aszitesmaus" mg/ml	in vitro Zellkultur µg/ml	Zellkultur-methode	Literatur
+ (solide Tumoren, Serum)	+ (Möglichkeit)	"massive cultures"	(9)
+	-		(10)
100-1000mal mehr als in Zellkultur¤			1)
3 - 15	10 - 100	Kulturüberstand	(7)
1 - 10	1 - 5o	Kulturüberstand	(11)
5 - 2o	10 - 100	keine Angaben	(6)
2 - 10	10 - 5o	Spinnerkultur Rollkultur	2)
-	5o - 200	station. Kultur	(5)
1 - 10	10	keine Angaben	3)
einige	100	station. Kultur	(4)
0,5-5	5 - 25	Kulturüberstand	(15)
40	2o - 1ooo	station. Kultur Spinnerkultur Rollkultur Kapillarsystem Dialyseverfahren	(17)
-	3,7 - 25	station. Kultur	(3)
-	7,1 - 9o	Rollkultur	
-	100 - 265	station. Kultur	(19)
-	14oo - 54oo	Dialyseverfahren	
100 1000mal mehr als in Zellkultur	-		(12)
-	74 - 2oo	Spinnerkultur	(21)

1) Hybridoma Techniques, Cold Spring Harbor Laboratory; EMBO, SKMB Course, Basel, 1980

2) EMBO practical course on hybridomas and monoclonal antibodies. The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 1982

3) Kurzkurs Zellkulturmethoden, Institut für Pharmazie, Berlin, 1984

bieten hat entscheidend zur Optimierung der in vitro-Produktion monoklonaler Antikörper beigetragen.

Im einzelnen wurden bisher monoklonale Antikörper gegen Hexokinase, Thromboxansynthetase und Strukturen von zwei Rostpilzen (Uromyces fabae, Uromyces vignae) hergestellt. Insgesamt wurden 39 verschiedene Klone in vitro in Rollkultur vermehrt. Zu Beginn der Untersuchung wurden 14 dieser Klone in der Maus vermehrt.

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration wurde nach der Reinigung durch Säulenchromatographie durch Proteinbestimmung nach Lowry (Hexokinase), nach Bradford (Uromyces fabae, Uromyces vignae) oder durch den BCA (Bicinchoninic acid)- Assay der Firma Pierce, Rockford, USA (Thromboxansynthetase) durchgeführt. Wie Tab. 2 zeigt, führte die in vivo-Methode zu Aszitesvolumina, die zwischen 1 und 6 ml pro Maus lagen. Nachdem zu Beginn der Untersuchungen 2 Punktionen vorgenommen wurden, wobei die Antikörperausbeute im 2. Punktat deutlich geringer war als im 1. Punktat, wurden die weiteren Mäuse nur noch einmal punktiert. Die Antikörperkonzentrationen lagen zwischen 2 und 28 mg pro ml Aszitesflüssigkeit. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Aszitesvolumina lag die Variationsbreite der Antikörperausbeute zwischen 10 und 60 mg pro Maus. Die Zeit zwischen der Injektion der Hybridomzellen und dem Auftreten eines Aszites schwankte zwischen 11 und 30 Tagen; und zwar bei den Tieren, die überhaupt einen Aszites entwickelten. Häufig bildete sich kein Aszites. In unseren Untersuchungen lag die Wahrscheinlichkeit einer Aszitesentwicklung zwischen 20 und 90% (Tab.2); d.h. die Injektion von 10 Mäusen mit Hybridomzellen führte in manchen Ansätzen nur bei 2 und in anderen Ansätzen nur bei 9 Tieren zu einem Aszites. Eine 100%ige Aszitesentwicklung konnten wir in unseren Untersuchungen nicht erreichen. Goding berichtet ebenfalls, daß gelegentlich nach Hybridomzellinjektion kein Aszites auftritt (7). Bei der Sektion von Mäusen, die mit Pristan und Hybridomzellen gespritzt worden waren, fanden wir immer intraperitoneale Tumoren, und zwar unabhängig davon, ob sich ein Aszites entwickelt hatte oder nicht. Bei einigen Mäusen kam es statt zu einer Aszitesentwicklung zum plötzlichen Tod. Die Tumoren wuchsen ent-

weder multipel in der Bauchhöhle oder in einem begrenzten Bereich. Häufig waren massive blutige Veränderungen an allen Organen zu finden, die für ein infiltratives Wachstum der Tumorzellen sprechen. Die von uns gemachten Befunde werden auch von Kuijpers beschrieben (13).

Bei dem in vitro-Produktionsverfahren lagen die Volumina des Zellkulturüberstandes zwischen 150 und 2000 ml (Tab.2), und die Antikörperkonzentration schwankte in den verschiedenen Ansätzen zwischen 40 und 220 g/ml. Hierbei wurden in der Regel in den kleineren Volumina größere Antikörperkonzentrationen pro ml erzielt als in den größeren. Die Gesamtmenge an Antikörpern pro Zellkulturansatz lag zwischen 20 und 120 mg. Neben unterschiedlichen Wachstumsbedingungen dürften vor allem unterschiedliche Eigenschaften der einzelnen Hybridome für diese Variationsbreite verantwortlich sein. Die Zeit der Hybridomzellvermehrung betrug im Durchschnitt 12 Tage, wobei man je nach der benötigten Antikörpermenge stark variieren kann. Ein Vorteil, der bei der Aszitesmaus nicht gegeben ist. In Rollkultur war in unseren Untersuchungen im Gegensatz zur Maus eine Antikörperausbeute zu 100% gegeben.

Material, Methoden

Zur Vermehrung monoklonaler Antikörper in der Rollerflasche werden $2{,}5 \times 10^5$ bis 5×10^5 Hybridomzellen pro ml Medium eingesetzt. Die Rollkultur wird mit 100 - 150 ml begonnen. Hierzu werden Hybridomzellen, die bis dahin in einer stationären Zellkultur in RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorium Institute Medium 1640) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) gewachsen waren, abzentrifugiert und in Rollkulturmedium aufgenommen:

60 % RPMI 1640
20 % Medium 199
20 % DMEM/F12 (im Verhältnis 1:1)
(Minimum Essential Medium nach Dulbecco)
10 mM HEPES (Hydroxyethylpiperazine-ethanesulphonic acid)
10 mM $NaHCO_3$
2 mM Na-Pyruvat
2 mM Glutamin
0,1mM PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid)
(Stammlösung: 0,1M in Äthanol)

Die Anfangskonzentration an FKS beträgt 5% - 8%. Die Rollerflaschen drehen sich mit 1U/min bei 37° C ohne CO_2 Begasung. Die Zellzahl und Viabilität werden regelmäßig - je nach Kloneigenschaft - in Abständen von 1 - 3 Tagen bestimmt. Bei einer Zelldichte von max. $1{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml wird das Rollkulturmedium ohne Zusatz von Serum verdoppelt. Diese Verdünnung des Serums erfolgt bei empfindlichen Klonen durch Serumzusatz im Rollkulturmedium langsamer. Die Serumkonzentration beträgt in der Endphase der Produktion 1% - 2%.

Die Antikörperkonzentration ist pro ml Rollkulturmedium oft zu gering, sodaß der Zellkulturüberstand eingeengt werden muß. Dies geschieht durch Tangentialfiltration und/oder Affinitätschromatographie. Ersteres Verfahren (Minitan, Millipore) konzentriert den Zellkulturüberstand um den Faktor 50. Dies reicht in vielen Fällen für die weitere Verwendung der monoklonalen Antikörper aus. Eine weitere Konzentrierung und Reinigung der monoklonalen Antikörper ist durch Säulenchromatographie an Protein A-Sepharose oder Protein G-Sepharose möglich. Die Zellkulturüberstände (100 ml bis 2000 ml) werden entweder auf Protein A-Sepharose je nach isoelektrischem Punkt des Antikörpers im Bereich von pH 6 bis pH 8 oder auf Protein G-Sepharose bei pH 7,5 aufgetragen und mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min bei 4°C durchgepumpt. Nach Spülen mit 50mM Kalium-Phosphatpuffer (pH-Wert entsprechend dem Zellkultur-

überstand) werden die an das Säulenmaterial gebundenen Antikörper mit 100mM Glycin/HCl-Puffer (pH 2,7, pH 3,5, pH 5, je nach Antikörpersubklasse) durch pH-Sprung eluiert. Durch Zugabe von 1,5M Tris/HCl Puffer, pH 10 wird die Antikörperlösung sofort auf pH 7 eingestellt und bei -20°C eingefroren. Mit der Reinigung durch die Säulenchromatographie erfolgt gleichzeitig eine Konzentrierung um den Faktor 50. Probleme durch aufkonzentriertes Kälberserum ergeben sich bei uns durch die geringe Serumendkonzentration (1% - 2%) nicht.

Ergebnisse, Diskussion

Die Ausbeute an monoklonalen Antikörpern in der Rollkultur liegt nach unserem Verfahren zwischen 40 g und 220 g pro ml Zellkulturüberstand. Je nach Zellkulturansatz entspricht das einer Antikörpermenge von 20 mg bis 120 mg. Die häufig gemachte Einwendung, daß die Zellkulturmethode nicht bei allen monoklonalen Antikörpern einsetzbar ist, können wir nicht bestätigen. In unseren Untersuchungen führte die Vermehrung von Hybridomen in der Zellkultur immer zur Produktion monoklonaler Antikörper (100%); in der Maus dagegen schwankte die Antikörperproduktion zwischen 20% und 90% (Tab.2).

Das Argument, daß monoklonale Antikörper gegen bestimmte Antigene nicht in Zellkultur produziert werden können, kann nur für die Immunisierung im Rahmen der Produktion monoklonaler Antikörper gelten. Dagegen kann die Vermehrung jeder einmal etablierten Hybridomzellinie in Zellkultur erfolgen. Hier ist vor allem eine systematische Optimierung der Zellkulturmethode wichtig.

Wir haben die Rollkulturmethode zur Produktion monoklonaler Antikörper im Labormaßstab systematisch optimiert und die von uns erzielten Ergebnisse zeigen, daß entgegen früheren Literaturangaben (Tab.1, Tab.2) nur ein 5- bis 20-facher Unterschied zwischen der in vivo- und der in vitro-Methode besteht, der zudem durch die Konzentrierung mit Hilfe eines Tangentialfiltersystems und/oder durch die Säulenchromatographie aufgehoben werden kann. Früher beschriebene hohe Ausbeuten an monoklonalen Antikörpern (5, 19, Tab.1) wurden in

Tab. 2: Produktion monoklonaler Antikörper in vivo und in vitro: zweijährige eigene Erfahrung der Autoren mit 39 verschiedenen Hybridomen

Vergleichs-faktor	in vivo: Aszites	in vitro: Rollkultur
Volumen (ml) je Tier bzw. Ansatz	1 - 6	150 - 2000
Antikörper-Konz.	2 bis 28 mg/ml	40 bis 220 µg/ml
Antikörpermenge/Ansatz	10 bis 6o mg	20 bis 120 mg
benötigte Zeit (Tage)	11 bis 30 ø 20	10 bis 16 ø 12
Wahrscheinlichkeit der Ausbeute	20 bis 90%	100%

Tab.3:

Investitionskosten für die in vitro-Produktion monoklonaler Antikörper

A. In vitro-Vermehrung der Hybridomzellen	
Rollerbrutschrank (je nach Größe)	7.500,-- bis 25.000,-- DM
<u>oder</u>	
Rollerflaschengerät (bei vorhandenem Warmraum)	5.000,-- DM
B. Konzentrierung und Reinigung des Hybridomzellüberstandes	
Tangentialfiltersystem (TFS)	ca. 7.000,-- DM
Filterblock für TFS	400,-- DM
<u>und/oder</u>	
Chromatographieanlage (ChA)	ca. 70.000,-- DM
Säule für ChA	1.000,-- bis 1.500,-- DM

einer stationären Zellkultur durch sehr arbeits- und zeitaufwendige Untersuchungen erreicht. Sollen monoklonale Antikörper als Reagenzien zu Forschungszwecken eingesetzt werden ist dieser Aufwand nicht möglich. Die Spinnerkultur gewährleistet zwar eine bessere Versorgung der Hybridomzellen mit Nährstoffen als die stationäre Zellkultur, führt jedoch zu einer mechanischen Irritation der Zellen durch die Rühreinrichtung, wodurch die Antikörperproduktion beeinträchtigt wird. Dagegen stellt die Rollkultur eine einfache aber effektive Möglichkeit zur in vitro-Produktion monoklonaler Antikörper im Labormaßstab dar. Hier werden die Zellen mechanisch nicht belastet, optimal mit Medium versorgt, und die Immunglobuline durch Zugabe des Proteasehemmers PMSF gegen freigesetzte Proteasen geschützt.

Als Rollereinrichtung kann bei Vorhandensein eines Warmraumes ein Rollergerät mit Aufbaudecks verwendet werden (z.B. Tecnoroll, Tecnomara). Wenn kein Warmraum vorhanden ist, ist die Anschaffung eines Rollerbrutschrankes erforderlich. Wir verwenden den Vismara Rollerbrutschrank (Tecnomara). Die Kapazität dieses Rollerschrankes (90x 1 l Flaschen bzw. 45x 2 l Flaschen) dürfte für viele Laborbereiche zu groß sein, zumal unsere Ergebnisse gezeigt haben, daß die Antikörperausbeute in den kleineren Volumina (100-500 ml) pro ml größer ist als in den großen Volumina (1-2 l), und daß die Ausbeuten an monoklonalen Antikörpern aus den kleineren Kulturvolumina bei Optimierung der in vitro-Methode für den Forschungsbereich ausreichen.
Ein deutscher Brutschrankhersteller (Heraeus) hat in Zusammenarbeit mit uns einen kleineren Rollerbrutschrank entwickelt, der im Herbst 1989 auf dem Markt sein wird. In diesem Brutschrank können Flaschen der Größe 500 ml bis 2 l gedreht werden. Seine Gesamtkapazität wird 12 x 0,5 l, bzw. 6 x 1 l und 6 x 0,5l oder 6 x 2 l Flaschen betragen.

Neben dem minimalen Arbeits- und Zeitaufwand ist die nicht notwendige Begasung der Zellkulturen ein großer Vorteil der Rollkulturtechnik. Die Flaschen können somit geschlossen bleiben und ohne Kontaminationsgefahr über Entfernungen transportiert werden. Hierdurch ist die zentrale Aufstellung eines Rollerbrutschrankes mög-

lich, sodaß die Kosten für die Anschaffung eines solchen Gerätes von mehreren Arbeitsgruppen getragen werden können. Die Verwendungsmöglichkeit von normalen Laborglasflaschen verschiedener Größe (500 ml, 1 l, 2 l) macht außerdem die einfache Handhabung dieser Zellkulturmethode deutlich.

Ein weiterer großer Vorteil der Rollkulturmethode gegenüber der Aszitesmaus ist die gute Steuerbarkeit der produzierten Antikörpermenge und der Produktionzeit, da jederzeit die produzierte Menge bestimmt und der Produktionsansatz gestoppt werden kann. Ein Vergleich der Effektivität von in vitro- und in vivo-Produktion monoklonaler Antikörper zeigt, daß beide Methoden gleich wirtschaftlich sind. Die Kosten für 1 l Zellkulturmedium und Zusätze sind mit 16,-- DM zwar doppelt so hoch wie die für eine Maus (Kauf und Haltung ca. 8,-- DM); dafür ist die Antikörperausbeute in der Zellkultur bei Anwendung unserer Methode im Durchschnittz doppelt so hoch wie in der Maus (Tab.2). Betrachtet man zusätzlich die durchschnittlich kürzere Zeitdauer und die höhere Wahrscheinlichkeit der Antikörperbildung (Tab.2) so ist die in vitro-Methode sogar eindeutig wirtschaftlicher als die in vivo-Methode.

Bei den Investitionskosten (Tab.3) fallen für beide Methoden für die Konzentrierung bzw. Reinigung der Antikörperflüssigkeit im wesentlichen Kosten für die Chromatographiesäulen an. Die Investitionskosten für die Chromatographieanlage dürfen nicht nur der Zellkulturmethode angelastet werden, da in vielen Forschungsbereichen eine solche Anlage vorhanden ist. Das zur Konzentrierung benötigte Tangentialfiltersystem kann zentral eingesetzt werden, da für verschiedene Klone je ein Filterblock gebraucht wird. Sowohl Filterblöcke als auch Säulen können regeneriert und mehrmals und für verschiedene Klone verwendet werden.

Tierschutzrechtliche Aspekte bei der Produktion monoklonaler Antikörper am Beispiel des deutschen Tierschutzgesetzes vom 22.8.86

Die wichtigste Frage bei der tierschutzrechtlichen Beurteilung der Produktion monoklonaler Antikörper ist die Entscheidung, ob es sich um einen Tierversuch handelt oder nicht. Da an Universitäten und anderen Forschungseinrichtungen die Produktion monoklonaler Antikörper im Rahmen von Forschungsprojekten zu Versuchszwecken durchgeführt wird, und die Eigenschaften der neu entwickelten monoklonalen Antikörper nicht vorhersehbar sind, ist die Produktion im Labormaßstab ein Tierversuch im Sinne des § 7, Abs.1 des deutschen Tierschutzgesetzes (TSchG). Dies vor allem deshalb, da dieses Produktionsverfahren für das Tier mit Schmerzen, Leiden und Schäden verbunden ist. Nach den "Beeinträchtigungsstufen bei Tierversuchen" (Scharmann, Bundesgesundheitsamt, Berlin, 1983/84) muß die Aszitesproduktion in die Stufe: "Erheblich (anhaltend)" eingeordnet werden. In den von Schnappauf (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, Hohenheim) 1984 festgelegten Kategorien der Schweregrade bei Tierversuchen ist die Aszitesproduktion in die Kategorie 5 von insgesamt 6 Kategorien einzustufen. Dieser Einordnung liegen klinische und pathologische Befunde bei der Maus sowie humanmedizinische Erkenntnisse zugrunde. So führt das Aszitesvolumen zu Spannungsschmerz. In der Humanmedizin gilt hier ein Richtwert von ca. 10% des Körpergewichtes. Das bedeutet, daß bei einer 30 g schweren Maus bei ca. 3 ml Aszitesflüssigkeit Spannungsschmerz auftritt. Viel schwerwiegender sind die Schmerzzustände, die durch die Peritonitis und durch das infiltrative Wachstum der Hybridomzellen entstehen. Bei einer Entscheidung, ob es sich bei der in vivo-Produktion monoklonaler Antikörper um einen anzeigepflichtigen oder um einen genehmigungspflichtigen[1] Tierversuch handelt, sind die oben beschriebenen Befunde hilfreich. Sie zeigen, daß es sich nicht um einen nach § 8, Abs.7, 2. Satz des deutschen Tierschutzgesetzes nur anzeigepflichtigen Tierversuch handeln kann, sondern um einen nach § 7, Abs.1 genehmigungspflichtigen Tierversuch, der für das Tier mit Schmerzen, Leiden und Schäden verbunden sein kann. Es ist somit nach § 7, Abs.2, letzter Satz zu prüfen, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren erreicht werden kann.

Die in vitro-Produktion monoklonaler Antikörper in Rollkultur stellt eine effiziente Alternative zur in vivo-Produktion dar. Obwohl nach § 9, Abs.2, Satz 3 des deutschen Tierschutzgesetzes ein Tierversuch aus Gründen der Arbeits-, Zeit- oder Kostenersparnis nicht durchgeführt werden darf, werden diese Gründe oft als Erklärung für die Nichtanwendung der Zellkulturmethode angeführt. Die von uns nachgewiesene Wirtschaftlichkeit und Effektivität der in vitro-Methode soll zur Durchsetzung der in vitro-Vermehrung monoklonaler Antikörper im Labormaßstab beitragen. Solange noch - bis zu einer einheitlichen gesetzlichen Regelung - Hybridomzellen in der Maus vermehrt werden, müssen die Tiere so schonend wie möglich behandelt werden. Richtlinien hierfür wurden vom "United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research" (20) erlassen und vom Bundesgesundheitsamt in Berlin übernommen. Sie besagen, daß eine Aszitesmaus nur einmal punktiert werden und daß das Aszitesvolumen maximal 20% des Körpergewichtes der Maus (ca. 30 g) betragen sollte. In der Schweiz gelten auf Grund des Artikel 14 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes seit dem 17.5.1989 die "Richtlinien für die Beurteilung von Bewilligungsgesuchen für Tierversuche zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern". Sie besagen, "daß das Aszitesverfahren grundsätzlich mit dem Tierschutzgesetz nicht vereinbar ist" und daß nach einer angemessenen Übergangszeit monoklonale Antikörper nur noch in Zellkultur produziert werden dürfen.

In Holland wurde im Juli 1989 von der Abteilung für Tierversuche der obersten Veterinärbehörde in Zusammenarbeit mit den Holländischen Gesellschaften für Biochemie, Immunologie, Mikrobiologie, Pathologie und Toxikologie ein Kodex zur Praxis bei der Produktion monoklonaler Antikörper herausgegeben. Die Behörde geht nach Veröffentlichung dieses Kodex davon aus, daß sich die Personen, die monoklonale Antikörper produzieren ohne gesetzliche Vorschriften von dem Mausverfahren auf das Zellkulturverfahren umstellen.

[1] Ein anzeigepflichtiger Tierversuch muß spätestens 14 Tage vor dem gewünschten Versuchsbeginn der Genehmigungsbehörde nur angezeigt werden. Ein genehmigungspflichtiger Tierversuch muß dagegen unter Mitbeteiligung von Tierschutzbeauftragten, Kommission nach § 15, TSchG (sog. Ethikkommission) und Genehmigungsbehörde genehmigt werden.

[1] ANDERSON, P.N.; POTTER, M.: Induction of plasma cell tumours in BALB/c mice with 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristan). Nature 222, 994-995 (1969)

[2] BIRCH, J.R.; THOMPSON, P.W.; BORASTON, R.: Production of monoclonal antibodies in large-scale cell culture. Biochem. Soc. Transactions 13, 10 - 12 (1985)

[3] BODEUS, M.; BURTONBOY, G.; BAZIN, H.: Rat monoclonal antibodies. IV. Easy method for in vitro production. J. Immunol. Methods 79, 1-6 (1985)

[4] CAMPBELL, A.M.: Monoclonal antibody technology. Amsterdam, New York, Oxford (1984)

[5] CLEVELAND, W.L.; WOOD, I.; ERLANGER, B.F.: Routine large-scale production of monoclonal antibodies in a protein-free culture medium. J. Immunol. Methods 56, 221-234 (1983)

[6] GALFRE, G.; MILSTEIN, C.: Preparation of monoclonal antibodies: Strategie and procedures. In Lagone and van Vunakis (eds) Methods in Enzymology 73, Immunological Techniques Part B, Academic Press, New York, 3-46 (1981)

[7] GODING, J.W.: Antiboby production by hybridomas. J. Immunol. Methods 39, 285-308 (1980)

[8] HOOGENRAAD, N.; HELMAN, I.; HOOGENRAAD, J.: The effect of pre-injection of mice with pristan on ascites tumour formation and monoclonal antibody production. J. Immunol. Methods 61, 317-320 (1983)

[9] KÖHLER, G.; MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497 (1975)

[10] KÖHLER, G.; MILSTEIN, C.: Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976)

[11] KÖHLER, G.: The technique of hybridoma production. Immun. Methods Vol. II, 285-298 (1981)

[12] KÖHLER, G.: Derivation and diversification of monoclonal antibodies. The EMBO Journal 4, 1359-1365 (1985)

[13] KUIJPERS, H.M.H.: Hybridomas in mice: welfare aspects. Symposium: Monoclonal antibodies, preparation, application and ethical aspects. Dutch Soc. for Lab. Animal Sci., (1989)

[14] LINDL, T.: Mass production of monoclonal antibodies: Technical, scientific and ethical considerations. Alternativen zu Tierexperimenten 10, 16-32, (1988)

[15] NEUMEIER, R.: Monoklonale Antikörper in Biologie und Medizin. Biologie in unserer Zeit 4, 97-102 (1984)

[16] NOEMAN, S.A.; MISRA, D.N.; YANKES, R.J.; KUNZ, H.W.; GILL III, T.J.: Growth of rat-mouse hybridomas in nude mice and nude rats. J. Immunol. Methods 55, 319-326 (1982)

[17] PETERS, J.; BAUMGARTEN, H.; SCHULZE, M.: Monoklonale Antikörper. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1985)

[18] SAMOILOVICH, S.R.; DUGAN, Ch.B.; MACARIO, A.J.L.: Hybridoma technology: new development of practical interest. J. Immunol. Methods 1o1, 153-170 (1987)

[19] SJÖGREN-JANSSON, E.;JEANSSON, S.: Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing. J. Immunol. Methods 84, 359-364 (1985)

[20] UKCCCR guidelines: Laboratory Animals 22, 195-201 (1988)

[21] VELEZ, D.; REUVENY, S.; MILLER, L.; MACMILLAN, J.D.: Kinetics of monoclonal antiboby production in low serum growth medium. J. Immunol. Methods 86, 45-52 (1986)

[22] WILNER, M.A.E.; TROUTMAN, H.D.; TRADER, F.W.; McLEAN, I.W.: Vaccine potentiation by emulsification with pure hydrocarbon compounds. J. Immunol. 91, 210-229 (1963)