



Technisch-wissenschaftliche und ethische Aspekte der Produktion monoklonaler Antikörper

Toni Lindl

Institut für angewandte Zellkultur und Institut zur Erforschung von
Alternativmethoden zum Tierversuch (IFA), Balanstr. 6, D-8000 München 80

Zusammenfassung

Die Produktion von monoklonalen Antikörpern im technischen Maßstab gewinnt zunehmend an Bedeutung. Doch sind die antikörperproduzierenden Zellen, die sog. Hybridomazellen, ungleich empfindlicher als Mikroorganismen, die leicht im größeren Maßstab gezüchtet werden können.

Es werden verschiedene in vitro und in vivo-Systeme vorgestellt, die heute schon geeignet sind, Hybridomazellen in größeren Mengen zu züchten, um monoklonale Antikörper zu gewinnen:

- a) "Spinner-Kulturen" sind mehr oder minder einfache Glasgefäße mit verschiedenen konstruierten Rührern, in denen Zellen durch dauerndes Durchmischen des Mediums mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden.
- b) Der Fermenter, wie er bisher zur Züchtung von Mikroorganismen Verwendung fand, ist in vielen Abwandlungen geeignet, größere Zellzahlen zu erzielen. Die verschiedenen Konstruktionen werden hier vorgestellt, wobei sich die Aufmerksamkeit in der Entwicklung heute auf den sog. "Dialysefermenter" konzentriert.
- c) Die Kapillarreaktoren sind Filtersysteme aus Hohlfasern, in denen Zellen in größerer Dichte wachsen können. Sie sind gut geeignet, im kleineren bis mittleren Maßstab monoklonale Antikörper zu produzieren.
- d) Die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern in der Bauchhöhle von Mäusen ("Ascitesproduktion") stellt eine billige und effektive Methode dar, um solche monoklonalen Antikörper in vivo zu produzieren.

Es werden die technischen Vor- und Nachteile dieser Systeme aufgezeigt, sowie die ethisch-rechtlichen Aspekte am Beispiel des neuen deutschen Tierschutzgesetzes bei der in vivo-Produktion monoklonaler Antikörper diskutiert.



English abstract:

**Mass Production of Monoclonal Antibodies:
Technical, Scientific and Ethical Considerations**

The mass production of monoclonal antibodies (MABs) becomes more important in the near future. In contrast to microorganisms, the antibody-producing hybridomas are very sensitive to the culture conditions in mass cell culture and therefore difficult to cultivate in bulk quantities.

The most common *in vitro* and *in vivo* systems for the production of monoclonal antibodies in bulk preparations are discussed.

For the mass production of monoclonal antibodies, several *in vitro* systems are in use or under development today:

- a) Spinner flasks represent the most simple culture system for producing antibodies. Various mixing devices were developed and different culture media were used for an efficient growth of the cells.
- b) Several fermenters exist for the growth of hybridoma cells and production of MABs with all kinds of stirrers, mixing devices and electronic control equipment. It is proposed that the "dialysis fermenter" will be the favorite equipment for future mass production of MABs.
- c) The capillary bioreactor is efficient for the production of MABs in small quantities. High cell densities and good quality of the harvested MABs can be achieved.
- d) The most common production system is still the *in vivo* production of MABs in the ascites fluid of mice. Technical and ethical aspects of this *in vivo* production are discussed in the light of the new German law for the protection of animals in biomedical experiments.

Einleitung

1984 erhielten zwei Immunologen für ihre Arbeiten, die sie nur 9 Jahre vorher publiziert hatten, den Nobelpreis für Medizin. Es waren dies der Engländer C. Milstein und der Deutsche G. Köhler, die für ihre "Entdeckung des Prinzips der Herstellung monoklonaler Antikörper" geehrt wurden. Sie fanden durch ihre Arbeiten eine Möglichkeit, maßgeschneiderte Antikörper in beliebig großen Mengen für die Diagnostik und für die Therapie vieler Erkrankungen und vieler Vorgänge in der Zelle zu erzeugen (1).

Frühere Versuche, Antikörper vorgegebener Spezifität zu erzeugen, waren samt und sonders fehlgeschlagen, bis Milstein und Köhler auf den Gedanken kamen, antikörperproduzierende B-Lymphozyten mit unsterblichen Myelomzellen zu fusionieren. Sie erhielten dadurch sog. Hybridomzellen, die einerseits den Antikörper, gegen den z.B. die Maus immunisiert worden war, produzierten, und andererseits hatten diese Hybride die Eigenschaft, unbegrenzt als transformierte Zellen zu wachsen (siehe Abb. 1).

In den letzten 10 Jahren hat sich nun die gesamte Diagnostik, vor allem in der Infektionsdiagnose und der Tumordiagnose, aufgrund dieser neuen Technologie rapide verändert. Die monoklonalen Antikörper gegen die verschiedensten Erreger und gegen die verschiedensten Antigene werden heute zu Dutzenden auf den Markt gebracht und in Gramm bzw. sogar in Kilogrammengen produziert, um der gewaltigen Nachfrage standzuhalten (2).

Leider hat diese Produktion der monoklonalen Antikörper eine sehr tierschutzrelevante Seite, denn wirkliche Massenproduktion solcher Antikörper ist heute in Kultur noch nicht "wirtschaftlich" genug. So ist man schon bald nach der Entdeckung dieses Verfahrens darauf gekommen, diese monoklonalen Antikörper in vivo, d.h. in der Maus zu erzeugen (3).

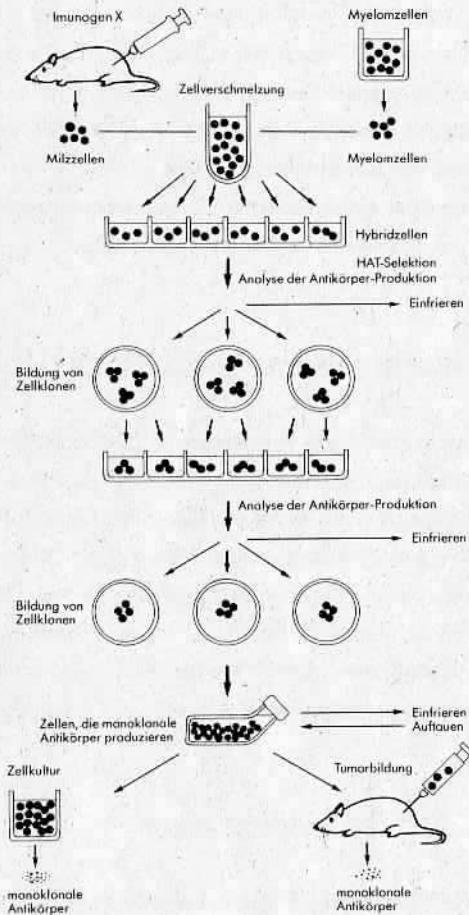


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Herstellung von monoklonalen Antikörpern.

Nach Immunisierung der Maus mit dem Immunogen X werden Milzzellen gewonnen, unter denen sog. B-Lymphozyten sind, welche Antikörper gegen das Immunogen X produzieren. Diese Lymphozyten werden mit Myelomzellen (Krebszellen des Blut-systems) zu Hybridzellen verschmolzen, welche anschliessend mittels chemischer Selektion (HAT-Medium: Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) gewonnen werden; nur Hybridzellen überleben längere Zeit in diesem HAT-Medium. Sie können dann vereinzelt (kloniert) werden, und die aus einer Zelle entstandene Kolonie (Klon) produziert nur einen Antikörper (monoklonaler Antikörper).

Im Unterschied zum klassischen Verfahren der Antikörperproduktion im immunisierten Versuchstier ist es zwar möglich, durch die erzeugte Hybridzelle unabhängig von einem Versuchstier Antikörper zu produzieren und das eigentlich ohne weiteres *in vitro*, doch die sog. Aszitesproduktion direkt im Versuchstier erbringt einen wesentlich höheren Antikörpertiter als dieses in Kultursystemen möglich ist (4-6).

In den folgenden Abschnitten sollen zunächst die technischen Aspekte sowohl der *in vitro*-Produktion als auch der *in vivo*-Produktion diskutiert werden.

1. Produktion monoklonaler Antikörper *in vitro*, d.h. mit Zellkultursystemen

Hierfür ist es anfangs notwendig, die Hybridzellen in relativ großer Ausgangskonzentration zu gewinnen. Dies und die Gewinnung stabiler Klone kostet zunächst sehr viel Zeit und Entwicklungsarbeit (ca. drei bis sechs Monate). Die Heranzüchtung solcher Hybridzellen wird normalerweise in Zellkulturflaschen oder in sog. "Rollerkulturen" durchgeführt. Eine größere Produktion in solchen Kulturgefäßen ist in der Regel nicht wirtschaftlich und wird auch heute nicht mehr durchgeführt. Ist die Zellzahl hoch genug, daß an die Massenkultur solcher Hybridzellen gedacht werden kann, gibt es einige Kultursysteme, die geeignet sind, relativ große Mengen an Antikörpern zu gewinnen.

Spinner-Kulturen

In den sog. "Spinnergefäßen" - Glasgefäße von einem bis zu zehn Litern Inhalt - können bis zu fünf Liter Medium enthalten sein, um eine maximale Konzentration von ca. zwei Millionen Zellen pro ml Kulturmedium zu erhalten. Vorteile dieser Rührkulturen sind die einfachen Konstruktionen solcher Spinnergefäße, die unkomplizierte Bedienung und die einfache Gewinnung der Kulturüberstände, die den gewünschten monoklonalen Antikörper enthalten.

Allerdings hat diese Methode einen entscheidenden Nachteil: es wird pro ml Kulturüberstand zu wenig produziert. Es sind pro Million Zellen in 24 h nur ca. 2 bis 4 µg Antikörper, so daß man mit diesem System auf höchstens 1 bis 5 g Antikörper pro Ansatz kommt.

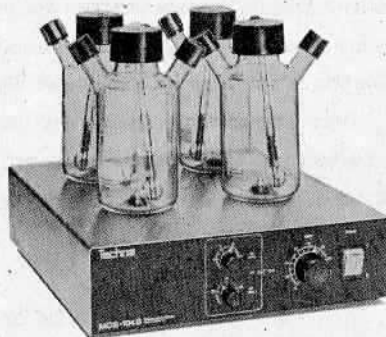
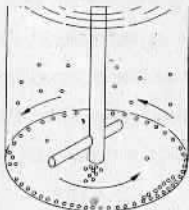
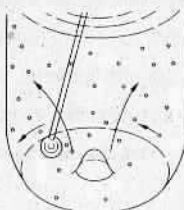


Abb. 2a: Spinnerkultur-
gefäße mit
Magnetrührer
(Techne)



Herkömmliche Spinnerflasche für
Microcarrierkulturen



Neuentwickelte Kulturf flasche für
Microcarrierkulturen. Die Anord-
nung des kugelförmigen Magne-
ten in der kreisförmigen Bod-
rinne ermöglicht höhere Zellaus-
beuten als bei herkömmlichen
Spinnergefäßen

Abb. 2b: Verschiedene Prinzipien der Rührer bei Spinnerkulturen

Ferner ist es von Nachteil, daß die Zellen *in vitro* meist noch Fremdproteinzusätze benö-
tigen (in der Regel Serum von fötalem Kalb), das auch noch - wenn auch in geringer
Konzentration - Rinderantikörper enthält. So ist dann später eine Reinigung dieses Kultur-
überstandes sowie eine Aufkonzentration notwendig, so daß insgesamt der Aufwand bei
der Gewinnung zeit- und geldintensiv wird.

Dies ist allerdings ein bis heute noch nicht vollständig gelöstes Problem bei jeder *in vitro*-
Züchtung von Säugerzellen. Es gibt vielversprechende Ansätze, chemisch definierte Zell-
kulturmedien ohne jeden Zusatz von Serum bei der Züchtung von Hybridomazellen *in vitro* zu verwenden (7).



Spinnerkulturen haben noch einen weiteren Nachteil: die Zellen müssen, um optimal vom Nährmedium umgeben zu sein, dauernd in Bewegung gehalten werden. Dies geschieht meist mit Hilfe von in den Gefäßen enthaltenen Rührern, die die Zellen ständig in Bewegung halten. Doch sind die Hybridzellkulturen relativ anfällig gegen Scherkräfte bzw. gegen jede mechanische Beanspruchung, so daß die Zellen eine geringe Vitalitätsrate (maximal 80 %) aufweisen, was letzten Endes zu einer geringeren Antikörperausbeute führt.

Fermenter

Die heute in der Zellkultur verwendeten Fermenter sind im Prinzip wie die klassischen Fermenter in der Mikrobiologie aufgebaut, wobei die Durchmischung ähnlich wie bei den Spinnergefäßen durch zentriert aufgehängte Rotorblätter gewährleistet wird. Die Fermenter können ein Volumen bis zu 10 m^3 erreichen, wobei die verschiedenen Parameter des Mediums, wie pH-Wert, CO_2 -Partialdruck und weitere Parameter automatisch kontrolliert werden können. Proben können durch ein spezielles System, das bauartabhängig ist, steril entnommen werden, und das Medium kann automatisch ergänzt bzw. ausgetauscht werden.

Die Vorteile gegenüber den Spinnerkulturen liegen zunächst in der besseren und auch schon automatisierten Überwachung des Zustandes des Mediums und der Zellen, und zudem kann die Suspension schonender durchmischt werden. Es kann sowohl im diskontinuierlichen Verfahren (Batch-Verfahren) gearbeitet werden als auch im kontinuierlichen Verfahren, wo das Medium in einem bestimmten Turnus ausgetauscht wird.

Die Konzentration an Antikörpern pro ml Kulturmedium bleibt allerdings gering, da nur ähnlich beschränkte Zelldichten wie bei den Spinnerkulturen erreicht werden können. Die Scherbelastung der Zellen ist ebenso groß und führt zu einem frühzeitigen Absterben der Zellen. Doch kann man hier mit großen Volumina arbeiten, so daß bei zwar beträchtlichem Aufwand Antikörper in Mengen von 100 g pro Ansatz und mehr zu erzielen sind.

Die Fermentertechnik ist in den letzten Jahren weiter entwickelt worden, und man hat hier verschiedenste Ansätze erprobt, um z.B. die Scherbelastung der Zellen durch die Rotorblätter abzusenken. So hat man z.B. Rührpaddel aus Seide konstruiert, die aufgrund spezieller Anordnung die Zellen bei der Durchmischung kaum mehr schädigen können.

Weiterhin hat man sog. Airliftfermenter konstruiert, die eine Durchmischung des Mediums nur alleine mit Sauerstoffblasen gewährleisten, die perlende Luft durchmischt die Zellen optimal im Medium. Trotz aller konstruktionsbedingten Verbesserungen ist immer noch eine erhebliche mechanische Belastung der Zellen durch den Durchmischungsprozeß selbst festzustellen.

Es wurde auch versucht, mittels gasdurchlässiger Membranen, die in den Fermenter eingebracht werden, eine optimale Sauerstoffversorgung der Zellen und eine gute Durchmischung ohne große Scherbelastung der Zellen zu gewährleisten. Diese Entwicklung scheint vielversprechend zu sein, allerdings verstopfen die Membranen leicht durch die im Medium enthaltenen Proteine und geben Anlaß zu Fehlern und Fehlfunktionen.

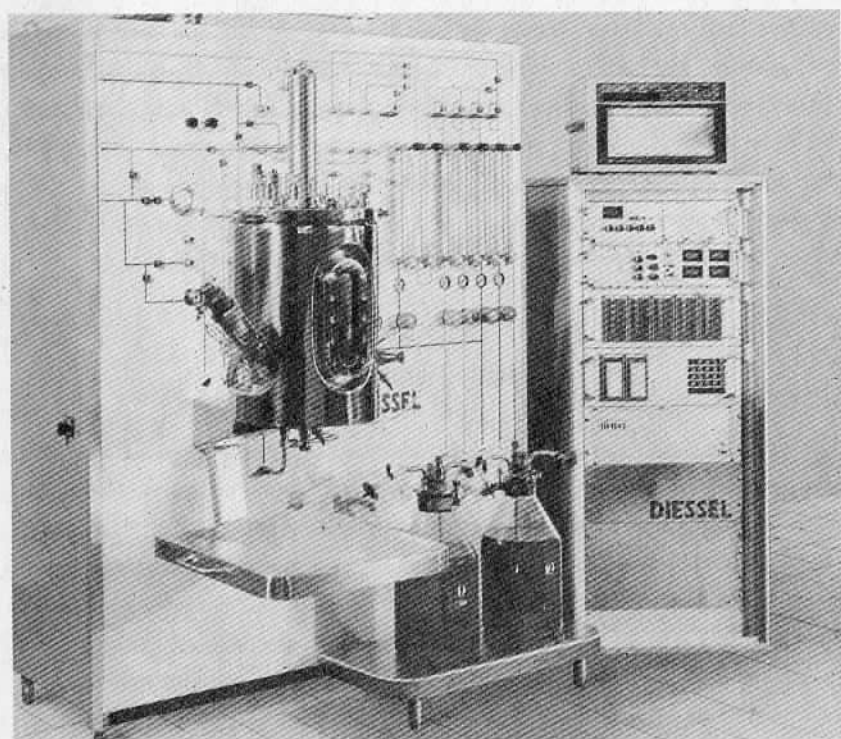


Abb. 3: Großfermenter für Säugerzellen mit Bioreaktor (Mitte), Mediumflaschen und Steuerungseinheit (rechts)



Um den Problemen der mechanischen Belastung in den Fermentern zu begegnen, hat man versucht, die Zellen zusammen mit Medium in geeignete Kügelchen einzuschließen. Dies ist für Hybridomazellen gelungen, indem man mit Polyamin quervernetztes Alginat zum Einschluß der Zellen verwendet. Hier ist es möglich, relativ hohe Zelldichten zu erreichen (bis zu 10 bis 15 Millionen Zellen pro ml Medium). Ferner ist die mechanische Beanspruchung der Zellen nahezu ausgeschlossen, da die Zellen in den quervernetzten Alginatmikrokügelchen eingeschlossen sind. Dieses Verfahren ist aufwendig und technisch nicht leicht zu handhaben. Deshalb gibt es einige Firmen, die sich auf diese Technologie spezialisiert haben. Man schickt der Firma eine entsprechend große Menge an Hybridzellen, die sie in speziellen Fermentern einsetzt. Nach der Kultivierung ist es einfach, die eingeschlossenen Zellen vom Kulturüberstand, der die gewünschten Antikörper enthält, zu trennen und den Kulturüberstand mit den Antikörpern aufzuarbeiten (8).

Die optimale Konzentration an Antikörpern wird in diesem System, wie übrigens in allen in vitro-Systemen, erst nach Erreichen der sog. stationären Phase erreicht, d.h. wenn die maximale Zellzahl erreicht ist. Die Vorteile dieses Systems sind die hohen Zelldichten und die guten Ausbeuten, allerdings kann man damit nur im diskontinuierlichen Betrieb arbeiten. Es können jedoch mit diesem Verfahren aus einem Ansatz mindestens 100 bis 500 g reine Antikörper gewonnen werden, und so bietet sich dieses System durchaus zur Produktion größerer Mengen an monoklonalen Antikörpern in vitro an.

Kapillarreaktoren

Der Aufbau dieser Reaktoren sieht folgendermaßen aus (s. Abb. 4): Als Wachstumsgefäß wird ein geschlossenes Filtermodul verwendet, in der die Zellen in einer Röhre wachsen, die im Inneren ein ganzes Filtersystem enthalten. Dieses semipermeable Filtersystem wird kontinuierlich von Medium durchströmt und hat eine Ausschlußgrenze für Moleküle mit einem Radius von 10.000 bis 100.000 Dalton. So kann das Medium ungehindert die Filter kontinuierlich durchströmen und die Zellen optimal versorgen, da alle erforderlichen Nährstoffe die Membran durchdringen können, während die Antikörper und alle anderen hochmolekularen Proteine bei den Zellen konzentriert werden. Dies resultiert in einer sehr guten Zelldichte, es werden hier bei kontinuierlichem Betrieb 200 Millionen Zellen pro ml erreicht.

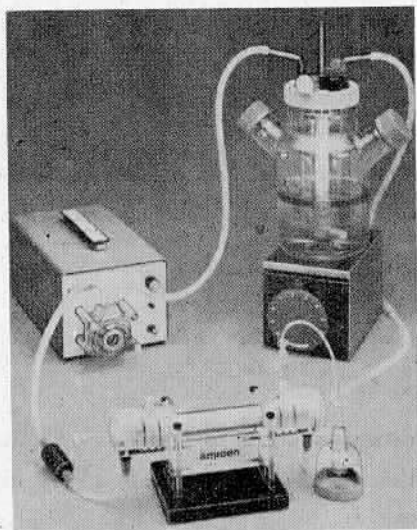


Abb. 4: Kapillareaktor (Amicon), dahinter Schlauchpumpe und Vorratsflasche zur Perfusion der Hohlfasern mit Medium.

Die Antikörper werden ebenfalls kontinuierlich in einem separaten Behälter (Ernte-Reservoir) aufgefangen und können dann direkt weiter verarbeitet werden. Nachteile dieser Technik sind aber ebenfalls vorhanden:

- 1) Es können fertigungstechnisch bedingt nicht beliebig große Filtermodule gebaut werden, so daß sich die maximal erreichbaren 0.5 Liter an extrakapillarem Volumen gegenüber den Fermentern von 1000 Litern oder mehr sehr bescheiden ausnehmen. Dementsprechend müssen die Zellen relativ lange gehalten werden (ca. 3 Wochen), um eine optimale Dichte und Ausbeute zu erlangen.
- 2) Die Zellen können für eine weitere Verwendung im Modul nicht wieder verwendet werden, da auch das Modul nicht mehr regenerierbar ist. Der Preis für ein derartiges Modul liegt bei ca. 500 bis 800 DM, so daß der Ansatz doch wieder recht teuer wird.
- 3) Der technische Aufwand an externen Tanks und Gefäßen sowie an Manipulationen ist hoch, dabei kann es leicht zu Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen kommen, so daß hier ein relativ hohes Risiko vorliegt. Allerdings ist die Zellausbeute bei geringer

mechanischer Beanspruchung relativ gut, so daß für die Gewinnung kleinerer Mengen an Antikörpern diese Module durchaus geeignet sind. Es ist wohl in Zukunft kaum zu erwarten, daß sich diese Methode zur großtechnischen Produktion durchsetzen wird. Zudem kann man davon ausgehen, daß sich in der nächsten Zeit bei den Großfermentern Entwicklungen ergeben, die geeignet sind, bessere Zelldichten zu erreichen, um das Verhältnis von Zelldichte, Antikörperausbeute und eingesetztem Medium zu optimieren.

Dialysefermenter

Eine derartige Entwicklung stellt der sog. Dialysefermenter dar, der eine Kombination des Kapillarmoduls mit den normalen Fermentereigenschaften erbringt (9). Die Grundeinheit stellt einen normalen Fermenter dar, wie er für Zellkulturen schon beschrieben wurde (s.o.).

Abweichend davon wird bei diesem Typ von Fermenter das verbrauchte Medium durch eine interne Dialysestation kontinuierlich ausgetauscht, wobei die Porengröße der Filtrationsmodule der Dialysestation so gewählt werden, daß nur die niedermolekularen Bestandteile des Mediums (Salz, Aminosäuren etc.) die Membran passieren können, während die hochmolekularen Bestandteile (Antikörper, fötale Kälberserumproteine oder andere von den Zellen ausgeschiedenen Proteine) zurückbleiben und so angereichert werden: Dadurch ist gewährleistet, daß die Zellen immer mit frischen Mediumkomponenten niedermolekularer Art in Berührung kommen und sich gleichzeitig die hochmolekularen Antikörper optimal anreichern können.

Dies bedeutet, daß nach kurzer Zeit nur mehr mit proteinfreiem Medium durchgespült werden muß, ein großer Vorteil gegenüber bisherigen Methoden (7). Darüber hinaus können die Mediumparameter automatisch überwacht und konstant gehalten werden (10). So können hier Zelldichten von maximal 15 Millionen Zellen pro ml Medium erreicht werden. Die Antikörperkonzentration erreicht Werte von bis zu 50 oder gar 75 μg pro ml Medium und 24 h bei einer Million Zellen. Allerdings ist bis heute auch hier nur das sog. diskontinuierliche Verfahren möglich, so daß immer nur eine begrenzte Zeit gearbeitet werden kann. Danach muß der Fermenter frisch aufbereitet, sterilisiert und erneut mit Zellen und mit Medium beschickt werden.

Es ist jedoch möglich, bei diesen Dialysefermentern die Zellen mittels Zentrifugation nach der Inkubationsphase zu gewinnen, wobei dann wieder eine lebende Population erhalten wird, die später erneut im Fermenter eingesetzt werden kann.

An einer kontinuierlichen Version eines solchen Dialysefermenters wird derzeit fieberhaft gearbeitet. Es gibt heute schon Prototypen, die es ermöglichen, wenigstens über drei Monate eine kontinuierliche Produktion monoklonaler Antikörper *in vitro* mit guter Ausbeute durchzuführen. Dieses Verfahren in Kombination mit der Mikroverkapselung stellt wohl heute die meistversprechende Entwicklung dar, um *in vitro* monoklonale Antikörper in einem größeren Maßstab zu gewinnen. Die Vorteile liegen auf der Hand:

- a) Erreichen hoher Zelldichten
- b) Laufende Überwachung des Zustands der Zellen und automatische Kontrolle des Mediums
- c) Abtrennung (vom Medium) und Konzentrierung der Antikörper
- d) Wiederverwendung der eingesetzten Zellen
- e) Produktion über längere Zeit möglich

2. Gewinnung monoklonaler Antikörper *in vivo*

Diese Methode wird heute üblicherweise benutzt, um größere Mengen monoklonaler Antikörper aus der Maus zu gewinnen (5). Dabei werden ca 10^6 bis 10^7 Zellen in eine mit Pristan vorbehandelte Maus oder in eine Nacktm Maus (athymische Mäuse; dies sind Mäuse ohne intaktes Immunsystem) intraperitoneal gespritzt. Danach entwickelt sich in der Bauchhöhle innerhalb einer Woche ein Tumor.

Die Pristanbehandlung beschleunigt erfahrungsgemäß die Aszitesproduktion und wirkt auch leicht immunsuppressiv, so daß die Tumorzellen (um solche handelt es sich bei den Hybridomazellen) relativ schnell unter optimalen Bedingungen heranwachsen können. Auf diese Weise können bis zu 1 g Antikörper pro Tier gewonnen werden. Die Gewinnung der Aszitesflüssigkeit erfolgt durch Punktion der Bauchhöhle. Diese Punktion kann ca. 3 bis 5 mal wiederholt werden, wobei sich bald ein solider Tumor in der Bauchhöhle des Versuchstiers entwickelt, der allerdings für die Produktion der Antikörper wertlos ist.



Dieses Verfahren hat - abgesehen von der Belastung der Versuchstiere, die gesondert (s.u.) behandelt wird - für den Hersteller große Vorteile:

- a) Diese Art Produktion monoklonaler Antikörper kann ohne teures, hoch ausgebildetes Personal durchgeführt werden. Außer einem Tierstall und einem Operationstisch zur Aszitesentnahme ist auch nicht allzuviel Ausrüstung notwendig.
- b) Ferner ist es in vielen Fällen nicht mehr notwendig, die Aszitesflüssigkeit zu reinigen, da es keine spezifischen Antikörper in der Bauchhöhle der Mäuse gibt, weil die Immunreaktion der Versuchstiere ja entweder unterdrückt oder nicht vorhanden ist.
- c) Selbst wenn nachgereinigt werden muß, ist das Verhältnis des Aufwandes und der Investitionen zum Ertrag (1 mg eines monoklonalen Antikörpers aus Aszitesflüssigkeit kann bis zu 500,- DM bringen) immer noch um eine Größenordnung besser als mit den bisherigen in vitro-Produktionssystemen.

Doch auch hier gibt es Nachteile, die in erster Linie in der Belastung der Versuchstiere und darüber hinaus in der möglichen Veränderung der Antikörper in der Bauchhöhle der Maus liegen:

Belastung der Versuchstiere

Zunächst muß davon ausgegangen werden, daß die Herstellung von monoklonalen Antikörpern an sich eine drastische Reduktion des Versuchstierbedarfs mit sich brachte, nimmt man an, daß pro polyklonalem Antikörper früher über Jahre hinweg mehrere Dutzend Kaninchen, Mäuse oder Schafe ihr Blut und letzten Endes ihr Leben lassen mußten. Jetzt ist der Bedarf an Mäusen pro Antikörper vielleicht auf drei bis maximal zehn bei der direkten Herstellung gesunken, wobei auch Versuchstiere zur Immunisierung benötigt worden sind

Im Laufe der letzten fünf Jahre ist die Zahl der produzierten monoklonalen Antikörper von jährlich einhundert auf ca. 5000 gestiegen. Damit ist nicht nur die absolute Zahl der Tiere, die zur Herstellung der Antikörper herangezogen wurden, sondern parallel dazu auch die Zahl der Mäuse für die Aszitesproduktion um ein Vielfaches gestiegen.

So hat sich letzten Endes eine Technik, die zu einer drastischen Reduktion des Verbrauchs an Versuchstieren führen sollte, in ihr Gegenteil verkehrt: es sind mehr Tierversuche durchgeführt worden und die Belastung der Versuchstiere hat in diesem Bereich zumindest nicht abgenommen, sondern - von der Aszitesproduktion her betrachtet - sogar drastisch zugenommen.

In der Neufassung des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 22.8.1986 im § 9 Abs. 2 steht: "Tierversuche sind auf das unerlässliche Maß zu beschränken. Bei der Durchführung ist der Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse zu berücksichtigen" (11). Ferner ist im gleichen Abschnitt unter Ziffer 3 vermerkt: "Leiden oder Schmerzen dürfen den Tieren nur in dem Maß zugefügt werden, als es für den Zweck unerlässlich ist; insbesondere dürfen sie nicht aus Gründen der Arbeits-, Zeit- oder Kostenersparnis zugefügt werden."

Dies bedeutet zumindest für die deutsche Rechtsprechung, daß eine Aszitesproduktion monoklonaler Antikörper nur in vitro durchgeführt werden dürfte, da im Gesetz (Tierschutzgesetz § 7 Abs. 2) folgende Passage steht: "Bei der Entscheidung, ob Tierversuche unerlässlich sind, ist insbesondere der jeweilige Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse zugrunde zu legen und zu prüfen, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren erreicht werden kann."

So stellt sich das Aszitesverfahren, wenn man das neue Deutsche Tierschutzgesetz betrachtet, als ein Verfahren dar, das ungesetzlich ist, und jeder, der eine in vivo-Produktion monoklonaler Antikörper in der Bundesrepublik Deutschland vornimmt, macht sich nach Tierschutzgesetz strafbar.

Hier erweist es sich, daß der Gesetzestext zwar besteht, doch die zuständigen Behörden sowohl mit der Materie als auch personell absolut überfordert sind. So kann es kommen, daß eine Anfrage bezüglich dieser Thematik vom zuständigen Bundeslandwirtschaftsministerium, das für das Tierschutzgesetz in der BRD federführend ist, im Tenor so beantwortet wurde, daß es sich dabei um genehmigungsfreie Tierversuche handle, ohne dabei zu berücksichtigen, daß die Aszitesproduktion keine Antikörperherstellung im gängigen Sinne ist.

Weiterhin argumentierte die Behörde, die für die Genehmigung von Tierversuchsvorhaben im Raum München zuständig ist, daß es sich dabei nicht um Tierversuche, sondern um Produktionsverfahren handle und somit keine tierversuchsrelevanten Tatsachen vorlägen.

Dies spricht einmal dem Tierschutzgedanken prinzipiell Hohn und ist auch in der Sache nicht richtig, da es sich durchaus um Tierversuche handelt, weil entweder die Tiere mit Pristan vorbehandelt (hier liegt ein genehmigungspflichtiger Tierversuch vor) oder Tiere ohne intaktes Immunsystem verwendet werden müssen, welche im Deutschen Tierschutzgesetz als sog. "Qualzüchtungen" gelten und prinzipiell außer für Tierversuchsvorhaben nirgends eingesetzt oder gezüchtet werden dürfen.

Technische Mängel der Aszitesproduktion

Die Produktion von monoklonalen Antikörpern in der Maus hat neben der obengenannten tierschutzrelevanten Seite auch technische Nachteile, die nicht unerwähnt bleiben dürfen:

- a) In der Aszitesflüssigkeit des Versuchstieres herrscht zwar ein optimales Wachstums-milieu für die Zellen, doch die Antikörper werden ins Innere der Bauchhöhle sezerniert; somit sind diese Antikörper Veränderungen ausgesetzt, die zu einer Verminderung der Affinität führen können. Es können in der Aszitesflüssigkeit proteolytische Enzyme enthalten sein, die unkontrollierbare Veränderungen am Antikörper vornehmen.
- b) Mit dem Antikörper können unerwünschte Nebenprodukte, wie unspezifische Mausproteine, mit in die Aszitesflüssigkeit sezerniert werden. So sind z.B. die Makrophagen des Tieres in der Lage, Lymphokine auszusecheiden, die zusammen mit den Antikörpern spezifische Veränderungen im Stoffwechsel der Tiere hervorrufen.
- c) Es ist bisher nicht möglich, monoklonale Antikörper anderer Spezies, wie z.B. der Ratte oder des Menschen, in der Bauchhöhle von Mäusen zu produzieren, da die Reaktion des Tieres auf das Fremdprotein doch noch stark genug ist, Antikörper gegen die Zellen bzw. gegen die artfremden Eiweiße zu erzeugen, oder aber die Zellen können von vorneherein nicht in der Bauchhöhle gedeihen (12).



- d) Weiterhin ist es nicht auszuschließen, daß durch proteolytische oder andere Enzyme der Maus eine Modifikation der Antikörper stattfindet, die z.B. einen Einsatz in der Humantherapie von menschlichen monoklonalen Antikörpern unmöglich machen.
- e) Es können in der Maus endogene Moleküle enthalten sein, die geeignet sind, die entstehenden Antikörper zu neutralisieren oder die sich an die Antikörper binden können. Solche Antikörper sind für die weitere Verwendung nutzlos.

Ausblick

Die Produktion monoklonaler Antikörper stellt sich als ein Janusgesicht dar. Auf der einen Seite ist der unbestreitbare Vorteil dieser neuen Technik zu sehen, die sich eines Tages auch auf dem Sektor der Therapie segensreich auswirken könnte (Einsatz von humanen monoklonalen Antikörpern ohne jeden Tierversuch). Andererseits ist es ein meist profitorientiertes, billiges Verfahren zur Massenproduktion dieser Antikörper unter Zuhilfenahme Tausender von Mäusen, die doch wieder Schmerzen und Leiden erdulden müssen, obwohl es hierzu eigentlich ausreichend Alternativmöglichkeiten gibt, wie die Dialysefermenter zeigen. Sie sind allerdings heute noch teurer und weniger gewinnbringend als die Tierversuche.

Literatur

- 1) KÖHLER G., and MILSTEIN C.: Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975)
- 2) RICHMOND C.: Die optimale Nutzung monoklonaler Antikörper. *BioEngineering* 1, 62-63 (1986)
- 3) ABRAMS, P.G., OCHS, J.J., GIARDINI, S.L., MORGAN, A.C., WILBURN, S., WILT, A.R., OLDHAM, R.K. and FOON, K.: Production of large quantities of human immunoglobulin in the ascites of athymic mice: implications for the development of antihuman idiotype monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 132 1611-1613 (1984)
- 4) LINDL T. und BAUER J.: Zell- und Gewebekultur. G. Fischer Verlag, Stuttgart (1987)
- 5) KENNETH R.H. and McKEARN T.J.: Monoclonal Antibodies. Plenum Press New York (1980)
- 6) PETERS J.H., BAUMGARTEN, H. und SCHULZE, M.: Monoklonale Antikörper. Springer Verlag, Berlin (1985)
- 7) MUZIK, H., SHEA, M.E., LIN, C.C., JAMRO, H., CASSOL, S., JERRY, L.M. and BRYANT, R.: Adaption of human long-term B-lymphoblastoid cell lines to chemically defined serumfree medium. *In Vitro* 18, 512-524 (1982)
- 8) NILSSON, K., SCHEIRER, W., MERTEN, O.W., ÖSTERBERG, L., LIEHL, E., KATINGER, H.D.W., and MOSBACH, K.: Entrapment of animal cells for production of monoclonal antibodies and other biomolecules. *Nature* 302, 629-630 (1983)
- 9) ADAMSON, S.R., FITZPATRICK, S.L., and BEHIE, L.A.: In vitro production of high titre monoclonal antibody by hybridoma cells in dialysis culture. *Biotechnology Letters* 5, 573-578 (1983)
- 10) FAZEKAS DE ST., GROAT, S.: Automated production of monoclonal antibodies in a cytostat. *J. Immunol. Methods* 57, 121-136 (1983)
- 11) GEROLD, H.: Tierversuche. Vistas Verlag Berlin 1987
- 12) BARON, D. und HARTLAUB U.: Humane monoklonale Antikörper. G. Fischer Verlag, Stuttgart (1987)

