



Diese Fachinformation ist eine aktualisierte Version der Richtlinie ‚Herstellung von monoklonalen Antikörpern 5.01‘. Aktualisiert wurden die Verweise auf Gesetzestexte. *Nicht mehr gültige Passagen wurden durchgestrichen sowie kursiv und in grauer Schriftfarbe vom gültigen Text abgesetzt.*

Juli 2017

## Fachinformation Tierversuche

### Herstellung von monoklonalen Antikörpern 5.01

#### A Zielsetzung und Anwendungsbereich

Ziel der Fachinformation ist es, dass bewilligungspflichtige **Tierversuche zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern (Aszitesproduktion) nur mehr im Ausnahmefall durchgeführt** werden. Für diese Ausnahmefälle legt die Fachinformation fest, welche Rahmenbedingungen bei der Durchführung des Aszitesverfahrens einzuhalten sind.

Die Fachinformation richtet sich an die **Behörden**, die mit dem Vollzug der Tierschutzgesetzgebung in Bereich Tierversuche betraut sind, ihre **beratenden Kommissionen** und an alle **Personen, die sich mit der Durchführung von Tierversuchen befassen** (Versuchsleiterinnen und Versuchsleiter, Tierpflegepersonal, Laborpersonal).

*Die vorliegende 3. Auflage unterscheidet sich in materieller Hinsicht nicht von der 2. Auflage. Sie enthält jedoch Teile der früheren Informationsschrift über monoklonale Antikörper in Form eines Glossars.*

#### B Rechtsgrundlagen

Tierversuche, die dem Tier Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen, es in schwere Angst versetzen oder sein Allgemeinbefinden erheblich beeinträchtigen können, sind auf das unerlässliche Mass zu beschränken (Art. 17 Tierschutzgesetz vom 16. Dezember 2005, TSchG, SR 455). Bei der Durchführung eines Versuchs dürfen einem Tier Schmerzen, Leiden oder Schäden nur zugefügt werden, soweit dies für den verfolgten Zweck unvermeidlich ist (Art. 20 TSchG). Die kantonale Behörde darf einen Tierversuch nicht bewilligen, wenn sein Ziel mit Verfahren ohne Tierversuche erreicht werden kann, die nach dem jeweiligen Stand der Kenntnisse tauglich sind (Art. 137 TSchV Abs. 2).

**Monoklonale Antikörper können grundsätzlich aus Zellkulturen (in vitro) gewonnen werden und müssen nicht mittels des Aszitesverfahrens im Tierversuch hergestellt werden.** Die zur Anwendung kommenden In-vitro-Methoden sind **nach heutigem Stand der Kenntnisse in den meisten Fällen als tauglich zu beurteilen**. Es gibt jedoch Spezialfälle, wo die Zellkulturverfahren nicht zum angestrebten Ziel führen. Es stellt sich somit die Frage, in welchen Ausnahmefällen die Gewinnung monoklonaler Antikörper im Tierversuch nach der Gesetzgebung als zulässig beurteilt wird und bewilligt werden darf.

Im Jahr 1989 wurden alle Gesuchsteller und Gesuchstellerinnen informiert, dass die Herstellung (Gewinnung) von monoklonalen Antikörpern im Aszitesverfahren mit dem Tierschutzgesetz grundsätzlich nicht vereinbar ist und dass Bewilligungsgesuche zunehmend strenger beurteilt werden, mit dem Ziel, bis in wenigen Jahren die In-vivo-Produktion unter Verwendung von Tieren zum Verschwinden zu bringen. In der vorliegenden 3. Auflage der Richtlinie wird erneut festgehalten, was in der 2. Auflage festgelegt worden ist, nämlich welche Ausnahmen und Übergangsfristen für die Einführung der In-vitro-Methode angebracht sind.

## C Bewilligungsgrundsätze

- 1 **Bewilligungsgesuche** für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern im Tierversuch (Aszitesverfahren) **sind in der Regel abzulehnen.**
- 2 **Ausnahmefälle:** Gesuche zur Durchführung des Aszitesverfahrens können in folgenden Fällen ausnahmsweise bewilligt werden:
  - a. Gewinnung monoklonaler Antikörper zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken in der **Humanmedizin**, wenn es sich um **Notfälle** (z.B. Behandlung einzelner Patienten) handelt;
  - b. Erhalten von einzelnen **Hybridomzelllinien**, wenn dokumentiert wird, dass diese in Zellkultur nicht oder **ungenügend wachsen oder infiziert** sind.
- 3 **Übergangslösung:** Gesuche zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern im Tierversuch können nach dem Grundsatz der Verhältnismässigkeit **bis längstens Ende 1994** bewilligt werden (Gewähren einer Übergangsfrist zum Einführen der In vitro-Methode in einem Labor), wenn der Gesuchsteller oder die Gesuchstellerin
  - a. ausreichend begründen kann, dass Mengen von monoklonalen Antikörpern benötigt werden, für die **einfache In vitro-Methoden nicht ausreichen** (stehende Kulturverfahren, Spinner und Rollerverfahren bis zu einer gewissen Flaschen-Anzahl) und
  - b. einen **Plan zur Einführung der In vitro-Methode** vorlegt, welcher ausreichende und realistische Angaben über den zeitlichen Ablauf, die budgetierten Mittel und die vorgesehenen Räumlichkeiten enthält.

## D Gesuchstellung

- 1 Es sind **getrennte Gesuche** einzureichen für:
  - a. Immunisierungsverfahren bei Versuchstieren zur Lymphozytengewinnung zur Hybridisierung;
  - b. Aszitesverfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken beim Menschen;
  - c. Aszitesverfahren zum Erhalten einzelner Hybridomzelllinien, wenn diese infiziert sind oder nicht genügend wachsen;
  - d. Aszitesverfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern als zeitlich befristete Übergangslösung.

Die Gesuche dürfen keine anderen Tierversuchsvorhaben (z.B. die Herstellung von polyklonalen Seren beim Kaninchen) beinhalten.

- 2 Für Gesuche betreffend Immunisierungsverfahren zur Lymphozytengewinnung sind Zusatzangaben nötig über (vgl. obige Ziff. 1 Bst. a):

- a. verwendete Antigene;
  - b. Anzahl und genaue Bezeichnung (Tierstämme) der Tiere, welche für die verschiedenen Antigene verwendet werden;
  - c. genaues Immunisierungsprozedere (inkl. Adjuvantien) und ungefähre Zeitdauer bis zur Milzgewinnung.
- 3 Für Gesuche betreffend Aszitesverfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern sind Zusatzangaben nötig über (vgl. obige Ziff. 1 Bst. b):
- a. Zweck der Verwendung der monoklonalen Antikörper und dafür benötigte Mengen (bezogen auf Anzahl Tests) (vgl. Kap. C Ziff. 2);
  - b. Verwendung der Antikörper i m gleichen Institut bzw. zum Austausch/Verkauf;
  - c. Herstellung von neuen oder bekannten Antikörpern;
  - d. Anzahl der verschiedenen monoklonalen Antikörper (resp. Hybridoma) und Mengen, in denen sie produziert werden sollen;
  - e. Anzahl Tiere und genaue Bezeichnung der Tierarten (inkl. Tierstämme), welche für die Herstellung der monoklonalen Antikörper verwendet werden;
  - f. Verwendung und Applikation von reizenden Substanzen zur Vorbehandlung der Bauchhöhle (z.B. Pristan);
  - g. Zeitraum zwischen Vorbehandlung und Tumorinduktion;
  - h. vorgesehenen Zeitraum zwischen Tumorinduktion und Antikörpergewinnung;
  - i. gegebenenfalls Plan zur Einführung der In-vitro-Methode (vgl. Kap. C Ziff. 3).

## E Rahmenbedingungen zur Durchführung des Aszitesverfahren

Die Bewilligung muss mit folgenden Bedingungen (**Auflagen in Ziff. 22 auf Formular B**) verbunden werden:

- a. **Häufige Kontrolle der Tiere** bezüglich ihres Allgemeinbefindens, mindestens einmal pro Tag, auch an Wochenenden und Feiertagen.
- b. Tötung der Tiere in der Regel vor der Aszitesgewinnung (**keine wiederholte Punktion der Bauchhöhle**). Eine oder zwei Punktionen am lebenden Tier können ausnahmsweise in jenen Fällen zugelassen werden, wo der Gesuchsteller resp. die Gesuchstellerin ausreichend begründen kann, dass unverhältnismässig viele Tiere eingesetzt werden müssten.
- c. Im Fall einer Bewilligung der Aszitespunktion beim lebenden Tier sind die **Daten der Durchführung der Einzelversuche den Behörden mitzuteilen** (Möglichkeit der Kontrolle).
- d. Sofortige Tötung der Versuchstiere bei deutlichen Anzeichen eines gestörten Allgemeinbefindens (Apathie, Inappetenz, Schmerzzeichen).
- e. Tiere, bei welchen die **Zunahme des Körpergewichts** während des Versuchs **20 %** überschreitet, sind unverzüglich zur Aszitesgewinnung zu töten.

## F Kontrolle der Versuchsdurchführung

Die kantonalen Vollzugsbehörden sind gehalten, die **Durchführung von Aszitesverfahren** bezüglich des Einhaltens der Rahmenbedingungen häufig zu **kontrollieren**.



## Glossar

### Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper sind immunbiologische Stoffe, welche hochspezifisch mit bestimmten Zellstrukturen reagieren. Sie werden in der Immunologie, der Virologie und der Biochemie sowie in weiteren Forschungsgebieten für viele Testmethoden benötigt. Die moderne Diagnostik kommt ohne sie gar nicht mehr aus (ELISA). Ihre Bedeutung wird in Zukunft noch steigen. Gewichtigen Anliegen wie dem gezielten Bekämpfen von Krebszellen, der Früherkennung von Krebs und anderen Erkrankungen sowie der Möglichkeit zur Herstellung reiner Immunglobuline (spezifisches Serum) für therapeutische Zwecke ist man durch die Möglichkeit, monoklonale Antikörper zu produzieren, näher gekommen. Tausende verschiedener monoklonaler Antikörper (darunter viele Konjugate) werden von verschiedenen Firmen vor allem aus den USA, aus England und Holland angeboten. Darüber hinaus entwickeln aber viele Forschergruppen eigene monoklonale Antikörper für spezifische Fragestellungen. Je nach Einsatzgebiet werden verschiedene Mengen monoklonaler Antikörper benötigt.

### Hybridomatechnik

1975 veröffentlichten Köhler und Milstein ihre Arbeit über das Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper: Das Tier, meistens eine Maus, wird wiederholt mit Antigen immunisiert. Nach Wochen bis Monaten wird das Tier getötet und die Milz entnommen. Unter den Milzzellen befinden sich B-Lymphozyten, welche Antikörper, unter anderen auch Antikörper gegen das verwendete Antigen, produzieren. Die Milzzellen werden mit Myelomazellen (Krebszellen des Blutsystems) zu Hybridzellen verschmolzen. Durch verschiedene chemische Selektionsverfahren wird bewirkt, dass nur Hybridzellen (antikörperproduzierende Krebszellen) in Kultur überleben. Sie können vereinzelt (kloniert) werden, so dass die aus einer Zelle entstandene Kultur nur einen bestimmten Antikörper produziert. Die Hybridzellklone, welche mit dem Antigen reagieren, werden angezüchtet. Da es sich bei den Hybridomas (Hybridzelllinien) um konstante Zelllinien handelt, kann mit ihnen weitergezüchtet werden, um auf diese Weise monoklonale Antikörper zu erhalten.

### Aszitesverfahren

Im Hinblick auf das Gewinnen grösserer Mengen monoklonaler Antikörper wird Mäusen Pristan (Mineralöl) intraperitoneal gespritzt, wodurch eine Bauchhöhlenreizung, aber noch kein Aszites (Ansammlung von Flüssigkeit in der Bauchhöhle) entsteht. Meistens werden immundefiziente Mäusestämme (Nacktmäuse) verwendet, da bei diesen die später implantierten Tumore besser angehen. 1 - 3 Wochen nach der Pristaninjektion werden den Mäusen Hybridomazellen (10<sup>6</sup> - 10<sup>7</sup> Zellen) in die Bauchhöhle appliziert. Im Lauf der nächsten 10 - 25 Tage entwickelt sich der Tumor im gesamten Peritonealbereich und produziert während des Vermehrungsprozesses grosse Mengen monoklonaler Antikörper, welche von den Zellen in die jetzt entstandene Aszitesflüssigkeit abgegeben werden. Wenn der Umfang des Aszites ein gewisses Mass erreicht hat, wird die Bauchhöhle mit einer Kanüle punktiert (man nennt dies auch "Melken"), und die Flüssigkeit wird abgesaugt. Dieses Prozedere kann ungefähr zweimal wöchentlich über 2 - 3 Wochen fortgeführt werden, bis der Tumor so zugenommen hat, dass das Überleben der Maus nicht mehr gewährleistet ist. Je nach verwendeter Myelomazelllinie entwickelt sich der Tumor schneller und aggressiver, so dass schneller Aszitesflüssigkeit geerntet werden kann und die Mäuse früher getötet werden müssen. Bei einem gewissen Prozentsatz entsteht keine Aszitesflüssigkeit, so dass keine Antikörper gewonnen werden können. Die gewonnene Aszitesflüssigkeit enthält in konzentrierter Form die monoklonalen Antikörper, welche oft verwendet werden können, ohne gereinigt zu werden. Das Aszitesverfahren stellt einen hochbelastenden Tierversuch dar.

## Zellkulturverfahren

Die selektionierten Hybridomazellen, welche den gewünschten Antikörper produzieren, werden je nach benötigter Menge Antikörper in kleinerem oder grösserem Umfang in vitro weitergezüchtet. Das zugesetzte Medium zur Ernährung der Zellen enthält in vielen Fällen fötales Kälberserum. Nach Adaptation der Zelllinien kann vielfach serumfreies Medium verwendet werden. Zum Züchten der Zelllinien verwendet man Flaschen (Rollerkulturen mit 0,5 l - 1 l Inhalt, Spinnerkulturen mit 1 - 10 l Inhalt), Kapillarreaktoren (Dialyseprinzip) oder Fermenter mit unterschiedlicher Kapazität (10 - 1000 l). Neuerdings sind Kleinfementer erhältlich, welche speziell auf die Produktion von im Labor benötigten Mengen ausgerichtet sind (Mini-Bioreaktoren mit Hohlfasersystemen). Die Antikörpermenge, welche eine Zelle pro Zeiteinheit maximal produzieren kann und die in den Überstand abgegeben wird, ist limitiert. Deshalb ist es wichtig, in den Zellkultursystemen eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen. Diese erreicht man nur, wenn die Wachstumsbedingungen für das betreffende Hybridom optimiert worden sind und dieses auch mit genügend Nährstoffen versorgt wird. Nicht jede Hybridomalinie lässt sich gleich gut in vitro züchten. Einige stellen hohe Ansprüche an das Nährmedium sowie an Wachstumsfaktoren. Auch ist je nach verwendeter Myelomalinie die Produktionsrate an Antikörpern verschieden. Der Überstand der Zellkulturen enthält die Antikörper, wenn auch in weit geringerer Konzentration als die Aszitesflüssigkeit. Verunreinigungen (Fremdproteine, z.B. aus dem fötalen Kälberserum) und der geringe Antikörpergehalt bedingen die Reinigung und das Konzentrieren des Überstandes, was technisch aufwendig und teuer ist.