

**CODE OF PRACTICE
VOOR DE PRODUKTIE
VAN MONOCLONALE
ANTILICHAMEN**

**Sectie dierproeven
juni 1989**

VOORWOORD

Sinds de eerste fusie van een antistof producerende cel met een zich goed in vitro vermeerderende tumorcel tracht men de produktie van antistoffen door deze hybride-cellen te verhogen.

Bij de in vivo produktie van monoclonale antistoffen is sprake van aanzienlijk ongerief voor de betreffende dieren. Om inzicht te krijgen in de aard en omvang van het gebruik van proefdieren bij de vermeerdering van monoclonale antistoffen werd door de Sectie dierproeven van de Veterinaire Hoofdinspectie eind oktober 1987 een enquête uitgeschreven. De Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde toonde zich bereid haar voorjaarssymposium in samenwerking met de Sectie aan dit onderwerp te wijden. Het symposium vond plaats op 17 juni 1988 onder de titel "Monoclonale antilichamen, bereiding, toepassing en ethische aspecten". Om te bevorderen dat degenen, die zich in het bijzonder bezighouden met de bereiding en toepassing van monoclonale antistoffen, het symposium zouden bijwonen werd contact opgenomen met de Nederlandse Verenigingen voor Biochemie, Immunologie, Microbiologie, Pathologie en Toxicologie, die hun leden op de hoogte stelden. Het programma kwam tot stand in goed overleg met vertegenwoordigers van genoemde verenigingen.

Tijdens het symposium werd geconcludeerd dat relevante informatie over in vitro methoden niet overal voorhanden is en dat dit symposium duidelijk in een behoefte voorzag. De aanwezigen waren het er tevens over eens dat de in vivo methode nog slechts is toegestaan, wanneer het gaat om kleine hoeveelheden monoclonalen ten behoeve van de research. Produktie van grote hoeveelheden monoclonale antilichamen dient daarentegen met behulp van een in vitro methode te geschieden.

Door de Sectie is een overleggroep in het leven geroepen, die bestond uit de volgende personen: Drs. H.F.P. Joosten, namens de Nederlandse Vereniging voor Toxicologie, Mw.dr. M.H.M. Kuijpers, namens de Nederlandse Vereniging voor Proefdierkunde, Dr. A.D.M.E. Osterhaus, namens de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie, Dr. W.P. Zeijlenaker, namens de Nederlandse Vereniging voor Immunologie en Drs. P. de Greeve (Sectie dierproeven, Veterinaire Hoofdinspectie) Taak van deze werkgroep was een CODE OF PRACTICE op te stellen voor de produktie van monoclonale antistoffen. De tekst van deze code is weergegeven in Deel I.

Om onderzoekers en proefdierdeskundigen een handreiking te bieden is besloten

naast de CODE ook aanvullende informatie te verstrekken (Deel II). Deze informatie betreft het verkrijgen en produceren van monoclonale antilichamen (hoofdstuk 1); de toepassing van monoclonale antistoffen in het biomedisch onderzoek (hoofdstuk 2); de mogelijkheden van in vitro produktie van monoclonale antilichamen (hoofdstuk 3); de voorwaarden voor toepassing van monoclonale antistoffen in de humane geneeskunde (hoofdstuk 4); het ongerief bij muizen met hybridoma's (hoofdstuk 5).

De Sectie dierproeven is er van overtuigd dat deze notitie een bijdrage zal leveren aan de discussie binnen de vergunninghoudende instellingen over het gebruik van muizen en ratten ten behoeve van de produktie van monoclonale antistoffen.

Over de betekenis van de Code of Practice wil de Sectie het volgende opmerken. Zij onderkent dat bij het opstellen van de Code rekening is gehouden met de stand van zaken van dit moment. Het is echter denkbaar dat dankzij de voortschrijdende technische mogelijkheden op het gebied van de produktie van kleine hoeveelheden monoclonale antistoffen de situatie anders komt te liggen en dat bijvoorbeeld over enkele jaren geen muizen en ratten meer voor dit doel behoeven te worden gebruikt. In een dergelijk geval zal de Code dienovereenkomstig worden bijgesteld. De Sectie gaat er van uit dat zij die voor hun werk monoclonale antistoffen nodig hebben met de Code rekening houden. De Inspectie zal er nauwlettend op toezien in hoeverre de Code metterdaad ingang zal vinden. Zij geeft aan deze werkwijze vooralsnog de voorkeur boven het stellen van regels.

Rijswijk, juni 1989.

-o-o-o-

INHOUDSOPGAVE

DEEL I. CODE OF PRACTICE VOOR DE PRODUKTIE VAN MONOCLONALE ANTISTOFFEN	7
--	---

DEEL II. AANVULLENDE INFORMATIE

Hoofdstuk 1. Algemene informatie omtrent het verkrijgen en produceren van monoclonale antilichamen, dr. W.P. Zeijlemaker	9
Hoofdstuk 2. Toepassing van monoclonale antistoffen in het biomedisch onderzoek, Dr. A.D.M.E. Osterhaus	15
Hoofdstuk 3. In vitro produktie van monoclonale antilichamen, Dr. H.F.P. Joosten	19
Hoofdstuk 4. Voorwaarden voor toepassing van monoclonale antistoffen in de humane geneeskunde, Dr. H.J.M. van de Donk	21
Hoofdstuk 5. Welzijnsaspecten, ongerief bij muizen met hybridoma's, Mw.Dr. M.H.M. Kuijpers	23



Hoofdstuk I. CODE OF PRACTICE VOOR DE PRODUKTIE VAN MONOCLONALE ANTISTOFFEN

1. Ten behoeve van de produktie van monoclonale antistoffen worden doorgaans hybridoma's gegenereerd na in vivo immunisatie van proefdieren. Bij deze immunisaties dient het ongerief tot het minimum beperkt te blijven.

2. Produktie van monoclonale antistoffen met behulp van hybridoma's is mogelijk in vivo en in vitro. De laatste methode verdient om verschillende redenen de voorkeur.

Ingeval besloten wordt tot produktie in vivo

= dient de onderzoeker zich vooraf door middel van een korte stage terdege op de hoogte te hebben gesteld van de experimentele procedure;

= dient de onderzoeker dit in het protocol van de dierproef te motiveren.

Hij dient tevens in te gaan op de verschillende onderdelen van de in vivo methode, zoals het aantal te gebruiken dieren, het gebruik van tumor-groeibevorderende stoffen, het aantal malen dat ascitesvloeistof zal worden afgenomen, toepassing van narcose ed.;

= dient de beslissing omtrent het tijdstip van afname van ascitesvloeistof, de frequentie en het doden van het proefdier in nauw overleg met de proefdierversorger of de biotechnische medewerker te worden genomen.

De proefdierteskundige (de functionaris ex artikel 14 van de Wet op de dierproeven) adviseert de Dierexperimentencommissie omtrent toepassing van de in vivo methode.

3. Wanneer voor de produktie van een monoclonale antistof meer dan 5 tot 10 muizen nodig zijn, dient de betreffende antistof uitsluitend met behulp van een in vitro methode te worden geproduceerd. De betreffende instelling dient daartoe of zelf over adequate weefselkweekfaciliteiten te beschikken of de produktie van de antistoffen uit te besteden aan een instelling die daarover wel beschikt.

-o-

OPMERKING:

Deze CODE zal worden bijgesteld, wanneer gewijzigde inzichten - onder meer als gevolg van de voortschrijdende technische mogelijkheden - dit rechtvaardigen.

-o-o-o-

DEEL II. AANVULLENDE INFORMATIE

Hoofdstuk 1. ALGEMENE INFORMATIE OMTRENT HET VERKRIJGEN EN PRODUCEREN VAN MONOCLONALE ANTILICHAMEN, dr. W.P. Zeijlemaker, Centraal Laboratorium van de Bloedtransfusiedienst van het Nederlandse Rode Kruis, Amsterdam.

1.1 Inleiding en begripsbepaling

Wanneer een organisme (mens of proefdier) wordt geconfronteerd met een lichaamsvreemd antigeen kan een immuun-respons optreden tegen dat antigeen. Deze immuunrespons kan aanleiding geven tot de vorming van antistoffen die gericht zijn tegen het aanvankelijk toegediende antigeen. Nu zijn de meeste antigenen complex, d.w.z. ze bevatten vele antigene determinanten, tegen elk waarvan een antistofrespons kan optreden. Zelfs één en dezelfde antigene determinant kan aanleiding geven tot de produktie van diverse antistoffen, met verschillende fijn-specificiteit en affiniteit. De vorming van deze verscheidenheid aan antistofmoleculen is het gevolg van de activatie en proliferatie van een diversiteit van B lymfocyten. Als gevolg van de activatie door antigeen (waarbij overigens ook T lymfocyten en macrofagen een belangrijke rol spelen) kunnen B lymfocyten gaan prolifereren en uiteindelijk differentiëren tot antistof-producerende plasmacellen. Een antistof-respons geeft meestal aanleiding tot de activatie van een groot aantal verschillende klonen van B lymfocyten, d.w.z. tot een polyclonale antistofrespons.

Teneinde een monoclonale antistof te verkrijgen moeten de antistofmoleculen die door één enkele cloon worden geproduceerd in homogene vorm worden geïsoleerd. Op dit principe is de hybridomentechniek gebaseerd.

Na immunisatie van een organisme willen we uit het totaal van de polyclonale antistof-producerende cellen één enkele cel expanderen tot een homogene (monoclonale) oelpopulatie. Dit wordt bereikt door de antistof-producerende cellen te immortaliseren (onsterfelijk te maken): de polyclonale B cel populatie wordt aangezet tot continue deling, zodat men vanuit één enkele cel een homogene populatie kan opkweken. Daartoe worden de antistof-producerende cellen gefuseerd met een continu groeiende cellijn die tot het zelfde celtype behoort als de antistof-producerende cellen zelf. In het muize-systeem gebruikt men een plasmacytomecellijn als fusie-partner. Deze celfusie geeft aanleiding tot de vorming van hybride cellen, die twee karakteristieke eigenschappen bezitten: ze hebben van de B cel het vermogen behouden om antistoffen te produceren, en van de plasmacytomecel het vermogen om continu te delen. Een aldus gevormde continu delende antistof-producerende cel wordt een hybridoomcel genoemd. Na dit stadium kan dan worden begonnen met de isolatie van een homogene, monoclonale populatie. Dit geschiedt met behulp van clonering: één enkele hybridoomcel wordt opgekweekt tot een cloon van identieke antistof-producerende cellen. De hybridoomcel met de gewenste specificiteit wordt geselecteerd op basis van de eigenschappen van de geproduceerde antistof, waartoe men b.v. een bindings-assay uitvoert op het gewenste antigeen. Hierbij geldt het principe dat men voor de selectie van een monoclonale antistof de zelfde techniek moet gebruiken waarin men die antistof later ook wil toepassen. De reactiviteit van een antistof in een immunofluorescentie-test kan b.v. geheel anders zijn dan in een agglutinatie-reactie.

Een belangrijk onderdeel van de hybridomentechniek betreft de uiteindelijke produktie van de monoclonale antistof in voldoende hoeveelheden voor de toepassingen die men in gedachten heeft. De "klassieke" techniek is de produktie van monoclonale antistoffen in de vorm van ascitesvloeistof in muizen, maar de laatste jaren is ook de produktie in vitro, in weefselkweek tot ontwikkeling gekomen.

We zullen de verschillende stappen van de hybridomentechniek voor de bereiding van monoclonale antistoffen bespreken, in het bijzonder voor wat betreft het gebruik van proefdieren, en eventuele alternatieven daarvoor.

1.2 De techniek

1.2.1. Keuze van de proefdieren.

Verreweg het grootste gedeelte van de tot nu toe geproduceerde monoclonale antistoffen is van muis-origine. De reden hiervan is dat geschikte continu groeiende plasmacytoma cellijnen, die voor celfusie nodig zijn, eigenlijk alleen voor de muis beschikbaar zijn. Naast muis worden echter ook wel ratte-monoclonale antistoffen geproduceerd, bijvoorbeeld wanneer men in de muis niet de gewenste antistof-specificiteit kan opwekken.

Natuurlijk bestaat er vanuit medisch-klinisch oogpunt veel belangstelling voor de produktie van menselijke monoclonale antistoffen. Afgezien van het feit dat daarbij soms celfusies worden uitgevoerd met muis-plasmacytoma cellijnen, onder vorming van mens-muis xenohybride cellen, zijn hier geen proefdieren voor nodig, zodat deze technieken hier niet aan de orde behoeven te komen.

Monoclonale antistoffen van andere diersoorten dan muis of rat zijn nauwelijks beschreven, ook weer vooral omdat er voor andere diersoorten tot nu toe nog geen geschikte plasmacytoma cellijnen als fusie-partners beschikbaar zijn.

We zullen ons dus voornamelijk beperken tot de muis, en hieronder ingaan op de verschillende stappen die nodig zijn bij de produktie van monoclonale antistoffen met de hybridomentechniek.

1.2.2. Immunisatie

De fusie-frequentie van een B lymfocyt met een plasmacytoma cel is laag, met andere woorden: slechts een klein gedeelte van de cellen zal uiteindelijk uitgroeien tot een hybride cel. Bovendien kan slechts een zeer klein deel van de B lymfocyten specifiek met een bepaald antigeen reageren. Een gevolg hiervan is dat de kans op het verkrijgen van een specifieke antistof-producerende hybridoma cel bijzonder klein is, b.v. $1 : 10^8$ cellen, of nog minder. Deze frequentie kan worden verhoogd door er voor te zorgen dat het percentage antigeen-specifieke B cellen wordt verhoogd. Dit kan men bereiken door middel van immunisatie van de muis vooraf, zodat het percentage antistof-producerende cellen in de lymfoïde organen wordt verhoogd.

Het is vrijwel onmogelijk om duidelijke en eenduidige regels voor immunisatie-procedures op te stellen. Uit de literatuur blijkt tot nu toe dat immunisatie-voorschriften vaak een kwestie van "trial and error" zijn; er zijn dan ook zeer veel verschillende protocollen in omloop. In het algemeen stelt men als richtlijn om voor oplosbare antigenen te immuniseren met 1 tot 50 µg per muis, in te spuiten in combinatie met een adjuvans (meestal wordt Freund's Compleet Adjuvans gebruikt, maar de laatste jaren zijn er verschillende nieuwe adjuvantia ontwikkeld). Over de te volgen immunisatie-route bij de eerste inspuiting van een antigeen bestaat geen eenduidige mening. Sommige onderzoekers bevelen intracutane injectie aan, maar dit is soms belastend omdat hierdoor zweren kunnen worden opgewekt. Ook de tamelijk veel genoemde immunisatie in de voetzolen geeft veel ongerief voor de dieren, en is waarschijnlijk onnodig. Daarom is subcutane, intraperitoneale of intramusculaire primaire immunisatie het meest gewenst. Na de primaire immunisatie worden booster-injecties gegeven. Meestal wordt het antigeen dan toegediend samen met Freund's incompleet adjuvans (d.w.z. zonder tuberkelbacteriën). Ook voor de booster-injecties worden heel wat verschillende schema's beschreven; over het algemeen echter geeft men 1 tot 3 booster-injecties met een tussenpoos van 2 tot 8 weken. De laatste booster-injectie kan het beste 2 tot 4 dagen voor de celfusie worden toegediend, nu geheel zonder adjuvans. De laatste booster wordt vaak intraveneus toegediend, waarbij overigens wel het risico bestaat

van een voor de muis fatale anaphylactische shock. Daarom heeft intraperitoneale boosterinjectie de voorkeur.

Wanneer het gaat om de produktie van monoclonale antistoffen tegen intacte cellen, dan wordt meestal zonder adjuvans geïmmuniseerd. Hoewel ook hierbij verschillende immunisatieschema's worden gehanteerd is het gebruikelijk om te immuniseren met 10^6 tot 5×10^7 cellen per muis, intraperitoneaal ingespoten. Vervolgens worden booster-injecties gegeven door ongeveer 10^6 cellen in te spuiten met tussenpozen van enkele weken, de laatste keer intraveneus, ongeveer 2 - 4 dagen vóór de fusie.

Een interessante wijze van immunisatie is de intrasplenale injectie van antigeen. Hierbij wordt het antigeen direct in de milt gespoten. De voordelen hiervan zijn tweërlei: men heeft minder antigeen nodig dan bij de klassieke immunisatie-schema's, en er is in principe slechts één immunisatie nodig, waarna binnen 3 dagen de celfusie kan plaatsvinden (1). De toepassing van deze techniek eist echter wel ervaring.

De laatste tijd zijn er ook procedures ontwikkeld voor immunisatie in vitro. Hiertoe worden miltoellen van de muis eerst geïsoleerd, en vervolgens in vitro gekweekt in aanwezigheid van het antigeen in kwestie, terwijl al dan niet verschillende B celgroei- en differentiatie-factoren worden toegevoegd. Deze methode kan voordelen bieden wanneer slechts zeer weinig antigeen beschikbaar is; bovendien lukt het soms op deze wijze monoclonale antistoffen op te wekken tegen b.v. auto-antigenen, waartegen normaliter geen respons optreedt.

Meestal zal men het resultaat van de immunisatie vervolgen aan de hand van de antistofrespons in het serum van de muis. De bloedafname voor het verkrijgen van serum-monsters kan men op verschillende manieren uitvoeren. De orbita-punctie verdient de voorkeur, mits deze wordt uitgevoerd door een ervaren deskundige.

In de praktijk zal men vaak een aantal (b.v. 6) muizen immuniseren, en de celfusie uitvoeren met cellen van de muis die de hoogste antistoftiter heeft ontwikkeld. De ervaring leert echter dat de antistoftiter in het serum niet hoeft te correleren met de uiteindelijke opbrengst aan hybridoomcellen die specifieke antistoffen produceren.

1.2.3. De celfusie

Als bron van lymfoïde cellen maakt men gebruik van cellen afkomstig van een geïmmuniseerde muis. In principe kan men cellen gebruiken van verschillende lymfoïde organen. In sommige gevallen wordt de voorkeur gegeven aan lymfekliercellen, vooral wanneer na lokale immunisatie cellen van een drainerende lymfeklier kunnen worden geïsoleerd. Vrijwel altijd zal men echter met cellen van de milt werken. Onder totale anesthesie wordt splenectomie uitgevoerd, waarna de muis wordt afgemaakt. Vaak is de opbrengst aan miltoellen echter veel groter dan men in één fusie-experiment kan verwerken. Soms wordt daarom hemi-splenectomie toegepast, zodat men van de zelfde muis later nogmaals miltoellen kan verkrijgen. Het blijkt echter in de praktijk zeer goed mogelijk de miltoellen te conserveren in vloeibare stikstof. Dit kan met de miltoellen zelf, of met de nog niet gecloneerde cellen na de celfusie. In beide gevallen kan men later alsnog de gewenste hybridoomcellen isoleren door de ingevroren cellen weer op te kweken. Hiermee wordt dan de voor de muis belastende hemi-splenectomie omzeild.

Van de geëxtraheerde milt wordt een celsuspensie gemaakt, waarna de fusie kan plaatsvinden. Als fusie-celijn gebruikt men voor muiscellen één van de standaard-plasmacytoma-cellijnen, zoals P3-NS1/1.Ag.4, of SP2-0-Ag14; dit zijn cellijnen die zelf geen immunoglobuline produceren, en die deficiënt zijn voor het enzym Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl-transferase (HGPRT), zodat ze zelf niet kunnen overleven in HAT-selectie-medium, in tegenstelling tot de hybride cellen die HGPRT-plus (+) zijn. Ook voor de rat bestaan er plasmacytoma-cellijnen (b.v. de lijn 1R-983F), maar tevens maakt men wel gebruik van

xeno-hybridisatie, d.w.z. lymfoïde cellen van een geïmmuniseerde rat worden gefuseerd met een muize-plasmacytomecellijn.

Voor de eigenlijke fusie worden de geïmmuniseerde miltoellen gemengd met de plasmacytomecellen, meestal in een verhouding van 10:1, waarna celfusie wordt geïnduceerd met behulp van poly-ethyleenglycol (PEG).

De verdere procedures van kweken van de hybridomecellen, HAT-selectie, cloneren en specificiteitstesten van de uitgescheiden antistof verlopen volgens min of meer gestandaardiseerde in vitro procedures, die in verschillende handboeken zijn te vinden. Daarom is het niet nodig deze technieken hier te bespreken.

1.2.4. Produktie van monoclonale antistoffen

Wanneer eenmaal een monoclonale antistof-producerende hybride celcloon is geïsoleerd wil men de antistof bereiden in voldoende hoeveelheden voor de gewenste toepassing. De "klassieke" produktie-methode is het inspuiten van de hybridomecellen in histo-compatibele muizen (of ratten), waardoor de vorming van ascitesvloei-stof wordt geïnduceerd. Meestal geeft het inspuiten van 10^6 tot 10^7 hybridomecellen i.p. per muis binnen 2 tot 4 weken tumor-vorming. Meestal treedt produktie van ascitesvloei-stof op; het volume is meestal 2 tot 5 ml per muis, met een antistofconcentratie die vergelijkbaar is met die welke in serum gevonden wordt, d.w.z. ongeveer 5 tot 15 mg per ml.

In sommige protocollen wordt aanbevolen voor de produktie van ascitesvloei-stof speciaal behandelde (b.v. bestraalde of anderszins geïmmuno-supprimeerde) muizen te gebruiken. Volgens de meeste onderzoekers is dit echter overbodig, tenminste, wanneer de produktie van ascitesvloei-stof plaatsvindt in muizen die histo-compatibel zijn met de in te spuiten hybridomecel. Wat betreft het belang van geslacht en leeftijd van de muizen lijkt het dat vrouwelijke dieren het meest geschikt zijn voor produktie van ascitesvloei-stof. In sommige protocollen wordt het gebruik van "retired breedere" aanbevolen.

Meestal worden, om de vorming van ascitesvloei-stof te bevorderen, de muizen enkele dagen vóór het inspuiten van de hybridomecellen, intraperitoneaal geïnjecteerd met Pristane (2,6,10,14 tetramethylpentadecaan), ongeveer 0.5 ml per muis. Het gebruik van Pristane is echter niet algemeen; bij sommige onderzoeksgroepen heeft men de ervaring dat het weinig invloed heeft op het succes van produktie van ascitesvloei-stof en daarom nodeloos belastend voor de muizen is, terwijl anderen juist vinden dat de behandeling met Pristane absoluut noodzakelijk is. Waarschijnlijk worden deze verschillen veroorzaakt door de aard van de gebruikte muizen, en de omstandigheden waaronder wordt gewerkt. In principe zou Pristane uitsluitend gebruikt moeten worden wanneer het strikt nodig is. Het zou echter niet juist zijn om het gebruik geheel af te keuren. Evenals b.v. immunisatie is ook produktie van ascitesvloei-stof tot nu toe vooral een kwestie van trial and error geweest.

Het zou gunstig zijn indien een systematisch onderzoek op dit gebied zou plaats vinden, waarin onder gestandaardiseerde condities verschillende hybridomecellen worden ingespoten in muizen van verschillende stammen met en zonder Pristane-voorbehandeling.

Er bestaat verschil van mening over de vraag hoe lang men kan doorgaan met de produktie van ascitesvloei-stof d.w.z. hoeveel malen men bij een muis ascitesvloei-stof mag afnemen. Sommige onderzoeksgroepen nemen slechts éénmaal ascitesvloei-stof af, waarna de muis wordt afgemaakt. Anderen menen dat het afnemen van ascitesvloei-stof juist verlichting brengt, en dat er vaker kan worden "getapt" als men er maar voor zorgt dat de muizen niet in een té slechte conditie geraken.

De laatste jaren zijn er verschillende technieken operationeel geworden voor de produktie van monoclonale antistoffen door middel van het kweken van hybridomecellen in vitro. Hiervoor zijn, naast de gewone weefselkweek-flessen en roller-bottles, diverse kweeksystemen (fermentors, hollow-fibres etc.) ontwikkeld, in verschillende afmetingen.

De beslissing om al dan niet ascitesvloeistof in muizen te gaan produceren zal natuurlijk mede worden bepaald door de hoeveelheid antistof die men wil bereiden. Wanneer men een monoclonale antistof slechts nodig heeft voor een klein aantal fluorescentie- of ELISA-testen, dan zal vaak de ascitesvloeistof van één muis voldoende zijn, en zou het voor veel onderzoekers bezwaarlijk zijn hiervoor een kweek in vitro op te zetten. Ook moet er rekening mee worden gehouden dat lang niet alle hybridoomcellen in vitro een goede groei en antistofproductie vertonen. Ook op dit gebied is meer onderzoek nodig; met name zal het nuttig zijn na te gaan in hoeverre men de groei-eigenschappen in vitro van een hybridoomcel kan veranderen door b.v. een passage via ascitesvloeistof.

Als vuistregel kan men stellen dat in vivo productie van ascitesvloeistof hoogstens toelaatbaar is voor antistof-hoeveelheden tot ongeveer 0,5 gram (equivalent met 5 tot 10 muizen), maar dat grotere hoeveelheden antistof in vitro geproduceerd zouden moeten worden. De keuze van de te gebruiken weefselkweek-techniek hangt van allerlei factoren af, voorzover die binnen de mogelijkheden van het betreffende laboratorium liggen.

3. Samenvatting

Bij de bereiding van monoclonale antistoffen is het gebruik van proefdieren (tot nu toe voornamelijk muizen) onvermijdelijk. De verschillende stadia van de hybridomentechniek: immunisatie, milt-extirpatie, productie van ascitesvloeistof leveren meer of minder ongerief voor de dieren op. Een vereiste is dat alle handelingen worden verricht door deskundige personen onder de eindverantwoordelijkheid van een onderzoeker ex artikel 9 van de Wet op de dierproeven. Toezicht van de proefdierdeskundige (ex artikel 14 van de Wet) is geboden.

Het is dringend gewenst dat aan verschillende aspecten (immunisatieprocedures, gebruik van adjuvantia, optimale productie van ascitesvloeistof, gebruik van Pristane, etc.) systematisch onderzoek plaatsvindt, om zo mogelijk tot gestandaardiseerde voorschriften te komen.

-o-

Literatuur

1. Spitz et al., J.Immunol.Meths. 70, 39 (1984)).

De technologie voor de bereiding van monoclonale antistoffen met de hybridomentechniek wordt uitgebreid behandeld in verschillende boeken. Enkele voorbeelden:

- = J.J. Langone and H. van Vunakis: Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal antibodies. In: Methods in Enzymology, vol. 121. Academic Press, New York, 1986. (Dit boek biedt in 900 pagina's een zeer uitgebreid en gedegen overzicht van alle technieken).
- = J.W. Goding: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, New York, 1987. Dit is een wat korter, maar zeer bruikbaar overzicht van de verschillende technieken.

-o-o-o-

Hoofdstuk 2. TOEPASSING VAN MONOCLONALE ANTISTOFFEN IN HET BIOMEDISCH ONDERZOEK, A.D.M.E. Osterhaus, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven

Sinds de introductie van de hybridoomtechnologie in 1975 door Köhler en Milstein, heeft het gebruik van monoclonale antistoffen in de gehele biomedische research een enorme vlucht genomen. Naast een scala aan toepassingen in de fundamentele research, heeft het gebruik in de diagnostiek van virale en bacteriële infectieziekten, van tumorziekten, maar ook bij epidemiologisch onderzoek geleid tot een ware revolutie. Zowel het direct aantonen van specifieke antigene determinanten in klinische monsters, als het aantonen van antistoffen gericht tegen zulke determinanten in serummonsters, waarbij gelabelde monoclonale antistoffen in zogenaamde competitie-assays werden gebruikt, werden mogelijk door de ongeëvenaarde specificiteit van deze reagentia. Zowel in de humane als de veterinaire diagnostiek heeft deze ontwikkeling dan ook geleid tot een groeiend arsenaal aan ook commercieel verkrijgbare diagnostische tests. De eerste voorbeelden van het succesvol gebruik van monoclonale antistoffen bij epidemiologisch onderzoek, kwamen van onderzoek naar influenza-, rabies- en poliovirusisolaten. Door het genereren en analyseren van zogenaamde "escape mutanten" van virussen bleek het eveneens mogelijk om epidemiologisch bepaalde veranderingen in vitro na te bootsen. Vooral voor het bepalen van vaccinatiestrategieën is dit type onderzoek van groot belang gebleken.

Naast een toenemend gebruik van monoclonale antistoffen voor verschillende therapeutische doeleinden, zoals tumortherapie en transplantatie, is ook het gebruik voor in vivo diagnostiek steeds belangrijker geworden. Vooral aan de eisen te stellen aan in vivo toe te passen monoclonale antistoffen is de laatste jaren veel aandacht besteed.

Een belangrijk toepassingsgebied is thans ook gelegen in de productie en controle van biologische producten. Bij verschillende productieprocessen worden immuno-affiniteits-zuiveringsprocedures met monoclonale antistoffen steeds vaker gebruikt en ook bij de bepaling van werkzaamheid en onschadelijkheid zijn monoclonale antistoffen van grote waarde gebleken.

Een geheel nieuw toepassingsgebied lijkt gelegen in de mogelijkheid om monoclonale antistoffen te gebruiken bij de ontwikkeling van een geheel nieuwe generatie van vaccins: idiotypische vaccins. Het is mogelijk gebleken zonder tussenkomst van antigenen, met anti-idiotypische antistoffen een specifieke immunrespons op te wekken tegen verschillende virussen en (micro)-organismen. Een panel van monoclonale anti-idiotypische antistoffen zou wellicht een goed alternatief kunnen vormen voor op meer conventionele wijze geproduceerde of te produceren vaccins.

Door de enorme vlucht die deze technologie in de afgelopen jaren heeft genomen, lijkt het welhaast onmogelijk om een complete opsomming te geven van alle thans gebruikte toepassingsmogelijkheden. In het algemeen kan worden gesteld dat op alle gebieden waar voorheen polyclonale antistofpreparaten werden gebruikt, deze in toenemende mate werden en worden vervangen door monoclonale antistoffen. De introductie van monoclonale antistoffen heeft niet alleen een enorme impuls gegeven aan meer toegepaste takken van biomedische onderzoek, waarbij vooral kan worden gedacht aan diagnostisch en epidemiologisch werk, maar eveneens aan vele takken van fundamentele research, waarbij de immunologie, de microbiologie en de pathologie vooralsnog het meest in het oog springen. Reagentia voor typering van nieuw ontdekte subsets van bijv. T-lymfocyten, voor identificatie van specifieke functies en localisaties van cellulaire antigenen, zijn hiervan duidelijk voorbeelden.

De unieke specificiteit van monoclonale antistoffen - ze herkennen slechts één epitoom - schept een groot aantal extra toepassingsmogelijkheden. Dit werd allereerst duidelijk toen deze antistoffen werden aangewend bij de bestudering van epidemiologische en diagnostische vraagstellingen en de opheldering van de antigene structuur op het niveau van individuele epitopen bij een aantal

virale antigenen (1, 2, 3). De introductie van monoclonale antistoffen bij productie- en controleprocessen voor biologische producten voor klinische toepassingen vormt een goed voorbeeld van de veranderingen die hierdoor mogelijk zijn gemaakt.

Vooraf op het gebied van de ontwikkeling, productie en controle van vaccins, antilichaampreparaten en immunomodulators, heeft het gebruik van monoclonale antistoffen gedurende de laatste tien jaar grote invloed gehad. Bij de ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen infectieziekten bleek allereerst de mogelijkheid om m.b.v. monoclonale antistoffen antigene structuren en hun variabiliteit te bestuderen tot op het niveau van individuele antigene determinanten of epitopen van grote waarde (tabel 1).

TABEL 1: Het gebruik van monoclonale antistoffen t.b.v. de ontwikkeling van nieuwe vaccins

-
- * bestudering antigene structuur en variabiliteit
definitie, selectie en productie van
immunogene structuren - conventionele kweek
 - rec.DNA synthese
 - peptide synthese
(“pepscan” methode)
 - * ontwikkeling van anti-idiotypische vaccins
-

De bestudering van de variabiliteit van influenza-, rabies- en poliovirussen (1, 2, 3) vormden hiervan de eerste voorbeelden en leidden onder andere tot gedetailleerde antigene kaarten van de immunodominante structuren. De generatie van zgn. “escape mutanten”, die ontstonden door virussen aan te kweken in aanwezigheid van bepaalde monoclonale antistoffen, maakte het mogelijk om antigene drift in vitro na te bootsen en antigenen die onder invloed van immunologische druk kunnen veranderen te identificeren. Met behulp van competitie-assays, gebruikmakend van direct gelabelde monoclonale antistoffen, bleek het eveneens mogelijk om een “mapping” van al dan niet voor de inductie van virusneutralisatie belangrijke epitopen uit te voeren op virusisolaten van epidemiologisch verschillende herkomst. Dit maakte het mogelijk om te komen tot een betere definitie en selectie van immunogene structuren die minimaal in preventieve vaccins aanwezig dienen te zijn. Dit geldt enerzijds voor de thans algemeen gebruikte op conventionele wijze geproduceerde levende of geïnactiveerde vaccins, als voor nieuwe generaties geproduceerd m.b.v. recombinant DNA en peptide synthetisetechnieken. Vooral ook voor de zgn. “pepscan methode” (4) waarbij het mogelijk is om op basis van bekende aminozuursequenties grote aantallen peptiden te synthetiseren en immunologisch relevante gebieden op te sporen door hun reactiviteit met antilichaampreparaten te bepalen, is het ter beschikking komen van panels van monoclonale antistoffen van cruciaal belang.

Een geheel nieuwe benaderingswijze om vaccins tegen infectieuze agentia te ontwikkelen, lijkt gelegen te zijn in het gebruiken van elementen van het immuunsysteem zelf in plaats van externe antigenen: anti-idiotypische antistoffen (voor review zie 5). Deze benaderingswijze is gebaseerd op de netwerktheorie van Niels Jerne en gaat ervan uit dat er “internal images” van externe antigenen moeten bestaan. Vele voorbeelden van het gebruik van anti-idiotypische antistoffen voor het opwekken van zowel B als T cel gemediateerde immuniteit in parasitaire, bacteriële en virale systemen zijn inmiddels gepubliceerd (6). Wanneer uiteindelijk inderdaad idiotypische structuren zullen worden gebruikt voor de inductie van specifieke immuniteit, lijkt het o.a. om productietechnische redenen het meest voor de hand liggend om hiervoor murine of wellicht humane monoclonale antistoffen als basis te gebruiken.

Het direct gebruik van monoclonale antistoffen in vivo blijkt enerzijds van interesse bij in vivo "imaging" van tumoren en anderzijds voor therapie- en preventiedoeleinden (tabel 2).

TABEL 2: Mogelijke toepassingen van monoclonale antistoffen bij de mens

-
- * in vivo beeldvorming tumoren
 - * therapie en preventie
 - oncologie
 - orgaan transplantaties
 - "schoning" beenmergsuspensies
 - infectieziekten
 - allergieën/auto-immunziekten
 - vergiftigingen/geneesmiddelenoverdosering
-

De risico's en beperkingen in relatie tot de wijze van produktie van monoclonale antistoffen, lijken vooral gelegen in mogelijke contaminatie van het toe te passen produkt met nucleïnezuren, met eventuele transformerende eigenschappen en met murine virussen. Het eerste risico lijkt door middel van goede produktie- en zuiveringsprocedures te testen in bijvoorbeeld dot blot hybridisatie tests, grotendeels te elimineren. De afwezigheid van eventueel humaan pathogene virussen in deze produkten lijkt slechts door een uitgebreid controlesysteem en goed gecontroleerde en gevalideerde produktiemethoden te garanderen (7).

Het direct gebruik van monoclonale antistoffen bij de produktie van biologische produkten, is vooral gelegen in immuno-affiniteitschromatografische (IAC) procedures. Door monoclonale antistoffen te gebruiken met specificiteit voor hetzij de te zuiveren component, hetzij bepaalde verontreinigingen kan met respectievelijk genoemde component direct zuiveren of de verontreiniging verwijderen. Vele voorbeelden zijn hiervan inmiddels bekend. De gezuiverde component kan bijvoorbeeld een geheel micro-organisme of virus-partikel zijn (8) of een bepaalde bijvoorbeeld immunogene component ervan (9). Aldus opgezuiverde componenten behoeven, wanneer ze bijvoorbeeld als onderdeel van een vaccin worden gebruikt, incorporatie in multimeren antigenen presentatievormen zoals liposomen of iscoms (9, 10). Ook bij de controles van biologische produkten worden steeds vaker monoclonale antistoffen gebruikt (tabel 3).

TABEL 3: Het gebruik van monoclonale antistoffen t.b.v. controles van virale vaccins

-
- * vaststelling identiteit
 - * kwantificering van immunogenen
 - * kwantificering/aantonen van contaminanten
 - * neutralisatie vaccin-virus bij in vivo/in vitro aantonen van vreemde agentia
-

Werden vroeger voor vele controledoeleinden polyclonale antisera gebruikt, de grote specificiteit, beschikbaarheid en standaardisatiemogelijkheden van monoclonale antistoffen hebben ertoe geleid dat deze thans veelal de voorkeur verdienen. Dit geldt niet alleen voor zgn. identiteitsbepalingen, maar tevens voor de kwantificering van immunogene componenten. Ook het aantonen en kwantificeren van notoire contaminanten zoals bovine serum albumine (BSA) kan routinematig m.b.v. simpele ELISA systemen gebruikmakend van BSA specifieke monoclonale antistoffen geschieden (11). Omdat vele virusvaccins

nog op primaire animale cellen worden geproduceerd, is het noodzakelijk de afwezigheid van animale virussen in het produkt aan te tonen. Hiertoe voert men in vivo en in vitro isolatieprocedures uit, waarbij het vaccin-virus m.b.v. een specifiek antiserum in zijn vermeerdering wordt geremd. Juist door de hoge specificiteit en de hoge biologische activiteit die met monoclonale antistofpreparaten kunnen worden verkregen zijn deze ook voor dit doeleinde meer geschikt dan conventionele polyclonale antiserumpreparaten.

Concluderend mag gesteld worden dat het gebruik van monoclonale antistoffen zijn intrede heeft gedaan in het gehele veld van de biomedische research en een ware revolutie heeft veroorzaakt.

-O-

Referenties

1. Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E., Webster, R.: Antigenic structure of influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature* **290** 713 (1981).
2. Koprowski, H., Wiktor, T.: Monoclonal antibodies against rabies virus. In: *Monoclonal Antibodies*, R.H. Kennett, T.J. McKearn and K.B. Bechtol (eds.), Plenum Press, New York and London, p.p. 335-351 (1980).
3. Osterhaus, A.D.M.E., Van Wezel, A.L., Hazendonk, T.G., UytdeHaag, F.G.C.M., Van Asten, J.A.A.M., Van Steenis, G.: Monoclonal antibodies to polioviruses; comparison of intratypic strain differentiation of poliovirus type 1 using monoclonal antibodies versus cross-absorbed antisera. *Intervirology* **20** 129-136 (1983).
4. Geijssen, H.M., Melen, R.H., Barteling, S.J.: Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *PNAS* **81** 3998 (1984).
5. UytdeHaag, F.G.C.M., Bunschoten, H., Weijer, K., Osterhaus, A.D.M.E.: From Jenner to Jerne: Toward idiotypic vaccines. *Imm.Revs.* **20** 93-113 (1986).
6. Osterhaus, A.D.M.E., Bunschoten, E.J., Weijer, K., UytdeHaag, F.G.C.M.: Modulation of the immune system towards anti-viral immune response using anti-idiotypic structures. In: *Elicitation and use of anti-idiotypic antibodies and their biological applications*, C. Bona (ed.), CRC Press Inc.: in press.
7. Gezondheidsraad: Monoclonale antistoffen: toepassingen bij de mens. Eerste advies inzake de in vivo toepassing van monoclonale antistoffen bij de mens op beperkte schaal. No. 1986/21 (1986).
8. Rimmelzwaan, G.F., Groen, J., Juntti, N., Teppema, J.S., UytdeHaag, F.G.C.M., Osterhaus, A.D.M.E.: Purification of infectious canine parvovirus from cell culture by affinity chromatography with monoclonal antibodies. *J. Virol. Meth.* **15** 313-322 (1987).
9. De Vries, P., Van Binnendijk, R.S., Van der Marel, P., Van Wezel, A.L., Voorma, H.O., Sundquist, B., UytdeHaag, F.G.C.M., Osterhaus, A.D.M.E.: Measles virus fusion protein presented in iscom induces haemolysis inhibiting and fusion inhibiting antibodies, virus-specific T cells and protection in mice. *J. Gen.Virol.* in press.
10. Morein, B., Sundquist, B., Höglund, S., Dalsgaard, K., Osterhaus, A.D.M.E.: Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* **308** 457-459 (1984).
11. Ter Avest, A.R., Van Steenis, G., Osterhaus, A.D.M.E.: Comparison of a counter current electrophoresis and an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine serum albumin in virus vaccines. *J. Biol. Standard.* **15** 245-250 (1987).

-O-O-O-

Hoofdstuk 3. IN VITRO PRODUCTIE VAN MONOCLONALE ANTILICHAMEN, Dr. H.F.P. Joosten, Organon International, Oss

3.1 Inleiding

In de eerste vijf jaren na de introductie van de monoclonale antilichamen (MCA) techniek in 1975, werden de meeste MCA's gemaakt door hybridoma cellen te kweken in de buikholte van muizen. De MCA's werden vervolgens geïsoleerd uit de ascitesvloeistoffen. Naarmate de gewenste hoeveelheden groter en de eisen t.a.v. de zuiverheid strenger werden en tevens de reductie van het proefdiergebruik meer gewenst werd, kwamen de in vitro produktiemethoden in de belangstelling.

Aanvankelijk werd gekweekt in fermentoren in aanwezigheid van hoge concentraties serum. Dit was niet erg aantrekkelijk. De concentratie van MCA in de kweekvloeistof was 1000 x lager dan in de ascitesvloeistoffen. Bovendien was de zuivering moeilijker door de aanwezigheid van hoge concentraties serumeiwitten.

Momenteel zijn er verschillende in vitro produktiemethoden beschikbaar. Hiermee is het ook mogelijk geworden in afwezigheid van serum te produceren. De in vitro methoden zijn niet alleen bruikbaar voor produktie grote schaal (g tot kg), maar ook voor produktie op laboratorium schaal (mg tot g). Er bestaat een verscheidenheid aan produktiesystemen: roller bottles (1 tot 2 liter), fermentoren (tot 2000 liter) en holle vezel systemen van diverse afmetingen. Recentelijk werd een zeer eenvoudige produktiemethode m.b.v. dialyse-slang ontwikkeld. Elk laboratorium met weefselkweekvoorzieningen kan nu met een bescheiden uitrusting MCA's produceren op 100 mg schaal. Het gebruik van ascites muizen voor produktie op laboratorium schaal is hiermee overbodig geworden.

3.2 Weefselkweeksupernatant

Dit is de klassieke methode voor het kweken van cellen. De schaalgrootte is 1 tot 2 liter. Indien men serumvrij wil produceren worden de hybridoma's opgekweekt in aanwezigheid van serum waarna de serumeiwitten worden uitgewassen. De incubatie wordt nog 2 tot 3 dagen voortgezet in serumvrij medium. Het supernatant kan dan 10 tot 100 mg MCA per liter bevatten.

3.3. Fermentor

Produktie van MCA's op industriële schaal vindt onder meer plaats in fermentoren. Deze homogene systemen kunnen 2000 liter medium bevatten. Bij gebruikmaking van continue perfusie en hoge oeldichtheid zijn MCA concentraties tot 500 mg/liter mogelijk. Bij conventionele batch produkties zijn deze hoge concentraties niet haalbaar. Hoeveelheden per batch bedragen ongeveer 100 gram bij een MCA concentratie van 50 mg/liter.

3.3. Holle vezelsystemen

Bij holle vezelsystemen bevinden de hybridoma's zich niet binnen in de holle vezel, maar daar buiten. Aanvoer van nutriënten en afvoer van afvalstoffen verlopen in de vezel. Afhankelijk van de poriegrootte van de vezelwand zal het gevormde produkt tussen de vezels blijven (het celcompartiment) of door de vezels worden afgevoerd.

Kunstnieren, in gebruik voor haemodialyse bij nierinsufficiëntie, worden ook toegepast voor de produktie van MCA's. Daarnaast zijn er holle vezel systemen in vele maten verkrijgbaar. Sommige zijn speciaal voor celkweekdoeleinden ontwikkeld en geschikt voor produktie op industriële schaal en op laboratorium schaal, zowel in aanwezigheid van serum als onder serumvrije omstandigheden. Voor produktie op laboratorium schaal wordt b.v. een module gebruikt van 25 ml. Hybridoma's worden eerst opgekweekt in roller bottles in serumhoudend medium, verzameld en in de dialysemodule gebracht. De cellen worden gedurende 2 weken geïmmerseerd aan de serumvrije omstandigheden. Hierna kan enkele maanden

den lang 2 x per week worden geoogst. De concentratie van het MCA in het medium bereikt een waarde die vergelijkbaar is met die in ascitesvloeistof (1, 2).

3.4. Produktie in dialyse-slang

Tegen zeer lage kosten en gebruikmakend van eenvoudige hulpmiddelen is het mogelijk MCA's te produceren op 100 mg schaal. De hybridoma's bevinden zich in 10 - 25 ml kweekmedium in een dialyse-slang. De slang wordt gehangen in voedingsmedium in een fles. De hybridoma's scheiden het MCA's af in de dialyse-slang. De MCA's kunnen de dialysemembraan niet passeren en hopen zich op in de dialyse-slang. Het is mogelijk de hybridoma's te adapteren aan serumvrije kweekomstandigheden. Het serumvrije medium in de slang kan over een periode van ongeveer 3 weken 2 x per week worden afgetapt en vervangen door vers medium (3).

—○—

Literatuur

1. O.T. Schönherr and P.J.J.A. van Gelder, Culture of animal cells in hollow fibre dialysis systems. *Animal Cell Biotechnology* 3 (1988) 337 - 355.
2. O.T. Schönherr, P.T.J.A. van Gelder, P.J. van Haes, A.M.J.M. van Oss and H.W.M. Roelofs. A hollow fibre dialysis system for the in vitro production of monoclonal antibodies replacing in vivo production in mice. *Develop. Biol. Standard* 66 (1987) 211 - 220.
3. J. van der Maaden, W. Koot en F. van Mael. In vitro kweek procedures ter vervanging van ascites inductie voor de produktie van monoclonale antistoffen. *Biotechniek* 28 (1989) 45-46.

—○—○—○—

VERGELIJKEND OVERZICHT PRODUKTIEMETHODEN

produktiesysteem	schaal	volume	conc. mg/ml	tijd weken
Ascitesvloeistof	50-100 mg per muis	5-10 ml per muis	tot 20	2-3
Roller bottle	10-50 mg per liter fles	1-2 liter	tot 0,1	2-5
Dialyse-slang	tot 100 mg per slang	10-25 ml	tot 1,5	2-5
Fermentor batchcultuur	g tot kg	tot 2000 liter	tot 0,5	2-10
Grote dialyse modulen	g tot kg	tot 1 liter	tot 20	3-10
25 ml dialyse module	> 100 mg	25 ml	tot 20	3-10

—○—○—○—

Hoofdstuk 4. VOORWAARDEN VOOR TOEPASSING VAN MONOCLONALE ANTISTOFFEN IN DE HUMANE GENEESKUNDE, Dr. H.J.M. van de Donk, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Bilthoven

Alvorens monoclonale antistoffen voor humane toepassing te mogen bereiden in Nederland, dient de Minister van WVC, gehoord het advies van de Gezondheidsraad (Commissie ex art.2, Wet Sera en Vaccins), een vergunning te verlenen. Het advies van de Gezondheidsraad zal in de regel gebaseerd zijn op de resultaten van een inspectiebezoek en een beoordeling van het registratiedossier.

In geval van import wordt alleen het registratiedossier beoordeeld, en wel door de Commissie ex art.14 van het Sera en Vaccinsbesluit behorend bij de Wet op Sera en Vaccins. Deze commissie neemt zelf een beslissing ten aanzien van de toelating van het produkt. Bovenvermelde is evenzeer van toepassing voor monoclonale antistoffen die in Nederland worden bereid of worden geïmporteerd met het doel uitsluitend klinische studies te verrichten.

De normen die beide commissies hanteren zijn allereerst het Norm Registratie Document (NRD) "Monoclonal Antibodies", opgesteld door het Rijks Controle Laboratorium (RCL) en door de Commissie ex art.14 onderschreven. Dit document bevat minimum eisen ten aanzien van produktie en kwaliteitscontrole testen.

Intmiddels is door een Europese werkgroep, Working Party on Biotechnology and Pharmacy, eveneens een document met minimeisen opgesteld. Dit document is na sanctionering door de Committee on Proprietary Medicinal Products (CPMP) opgenomen in de serie "Notes to applicants for marketing authorizations" en getiteld "The production and quality control of monoclonal antibodies of murine origin intended for use in man". Dit Europese document is een synthese van enkele reeds bestaande documenten in lidstaten van de Europese Gemeenschap, waaronder het Nederlandse document. Aangezien het Europese document een consensus tussen de lidstaten weerspiegelt is het minder gedetailleerd dan het NRD. Dit Europese document zal in toenemende mate belangrijk worden bij de evaluatie van registratiedossiers, met name bij aanmeldingen in meer dan één land (Multi-State Procedure).

Een derde document dat van belang is, is het advies uitgebracht door de Gezondheidsraad over monoclonale antistoffen, bestaande uit een eerste advies en een eindadvies. De toenmalige staatssecretaris van WVC heeft de Gezondheidsraad verzocht om een advies uit te brengen over de voordelen en de gevaren die aan in vivo toepassing van monoclonale antistoffen bij de mens zijn verbonden en omtrent de beperkingen die bij deze toepassing in acht behoren te worden genomen. Het eerste advies beperkt zich tot monoclonale antistoffen waarvan de produktie zich in een experimenteel stadium bevindt en waarvan de werkzaamheid in veldproeven bij de mens moet worden onderzocht. Het gaat daarbij om relatief kleinschalig gebruik. Het eindadvies betreft de toepassing van monoclonale antistoffen in ruimere zin.

Er zijn een aantal aspecten die de drie documenten gemeen hebben, met name de voorkeur voor de in vitro kweek van hybridoma cellen boven de in vivo bereiding (via ascites). In vitro kweek geeft minder kans op microbiologische besmetting, leidt tot een betere standaardisering en tot minder proefdiergebruik. In het CPMP document komt dit tot uiting in een beperkter aantal testen op afwezigheid van virussen in geval van in vitro kweek.

Het Gezondheidsraad advies is zeer specifiek waar het gaat om de verontreiniging met DNA. Via twee risico-analyses wordt geschat dat de kans op het opwekken van tumor bij toediening van 100 picogram DNA (afkomstig uit hybridoma cellen) resp. 1.10^{-7} en 5.10^{-11} zou bedragen. Met klem wordt erop gewezen dat deze getallen het resultaat van schattingen met enige aannames en niet van berekening zijn. Niettemin illustreert dit de ruime veiligheidsmarge met betrekking tot residueel DNA zolang er enkele effectieve zuiveringsstappen worden toegepast en er geen exorbitante hoeveelheden monoclonale antistoffen worden toegediend.

De toelatingscommissie - de zogenoemde Commissie ex art.14 - heeft tot nu toe registratiedossiers getoetst aan het NRD. Deze werkwijze zal vooralsnog worden stopgezet. Dit NRD zal binnenkort worden aangepast aan het Europese document voorzover er afwijkingen zijn.

De navolgende, beknopte bespreking is dan ook gebaseerd op het Europese document en zal zich beperken tot specifieke bepalingen voor monoclonale antistoffen en voorbij gaan aan algemene bepalingen zoals Good Manufacturing Practice.

De oorsprong van de myeloma cellijn en van de lymfocyt dient nauwkeurig omschreven te worden, bovendien dient de gezondheid van de donor van antigeen materiaal vastgelegd te worden. De fusie en klonering dient volledig beschreven te worden, evenals de karakterisering van het fusieproduct.

De eventuele reactie van de monoclonale antistof met een reeks van menselijke organen dient onderzocht te worden. Er worden in totaal 26 organen vermeld, welke deel uit moeten maken van de organen die bij het onderzoek worden betrokken. Het lijkt waarschijnlijk dat in de praktijk enige soepelheid wordt betracht.

Het onderzoek van de seed lot, de eenmalig aangelegde partij hybridoma's waar steeds vanuit wordt gegaan bij elke nieuwe kweek, dient uitvoerig te gebeuren. De stabiliteit van deze cellen dient te worden aangetoond en de afwezigheid van microbiologische (m.n. virale) contaminatie dient onderzocht te worden. Er zijn enkele virussen (Hanta, LCM en Reo3) die perse niet in de (muizen)hybridoma's mogen voorkomen. Indien andere virussen aanwezig zijn, zal in een later stadium van de produktie aangetoond moeten worden dat de gevonden virussen inmiddels zijn verwijderd c.q. geïnactiveerd. In ieder geval van in vivo produktie, dienen de muizen die hiertoe gebruikt worden op afwezigheid van virussen onderzocht te worden, zoals eerder vermeld.

In geval van continu cultuur dient het begrip (homogene) partij door de fabrikant vastgesteld te worden.

De zuiveringsstappen dienen enerzijds de gewenste immunobiologische eigenschappen van de monoclonale antistoffen niet nadelig te beïnvloeden en anderzijds microbiologische en DNA verontreinigingen tot veilige proporties terug te brengen. Validatie studies waarbij bijvoorbeeld virussen en radioactief gelabeld DNA worden toegediend aan het uitgangsmateriaal zijn hierbij zeer gewenst.

De zuiverheid van het eindproduct dient met een aantal verschillende technieken te worden vastgesteld, met name de hoeveelheid residueel DNA dient bepaald te worden.

Op dit moment (XI-88) is door de CPMP een positief advies uitgebracht met betrekking tot monoclonale antistoffen en zij twee aanvragen recent ter hand genomen. De Commissie ex art.14 heeft het genoemde CPMP advies overgenomen en ten aanzien van vier aanvragen voor veldproeven positief gereageerd, twee andere zijn zojuist in behandeling genomen.

Aanstaande indieners van dossiers over monoclonale antistoffen worden met klem aangeraden van genoemde documenten kennis te nemen.

Hoofdstuk 5. WELZIJNSASPECTEN, ongerief bij muizen met hybridoma's; Mw.Dr. H.M.H. Kuijpers, CIVO-Instituten TNO, Zeist

5.1 Klinisch beeld

Dieren met intraperitoneaal getransplanteerde hybridoma's hebben een opgezette buik, o.a. als gevolg van ascites en tumorgroei. De buikwand wordt in relatief korte tijd opgerekt, en dit veroorzaakt pijn. De dieren vertonen een algehele malaise, zijn verzwakt, uitgedroogd, anemisch en apathisch. Zonder interventie sterven ze na ongeveer 2-4 weken als gevolg van cachexie, dehydratie en complicaties van de tumorziekte.

5.2 Pathologisch beeld

In het navolgende wordt het sectiebeeld beschreven van een aantal mannelijke, deels spontaan gestorven, deels geëuthanaseerde muizen, 2-3 weken na hybridoma transplantatie, en na 0-2 maal verzamelen van ascitesvloeistof. De muizen waren niet voorbehandeld met Pristane. Tevens werd sectie verricht op muizen 10-20 dagen na behandeling met alleen Pristane.

Het pathologisch beeld is het beeld van een al dan niet metastaserende tumor en kan zich diertengevolge in vele vormen presenteren.

Er werd vocht in de borstholte aangetroffen (hydrothorax). De buikholte bevatte bloederig vocht en fibrinedraden, en verklevingen van buikorganen onderling, wijzend op buikvliesontsteking (peritonitis). Het maagdak kanaal was leeg. De milt was veelal sterk gezwollen, nieren en lever bleek. De buikholte was bezaaid met tumoren, met name ter plaatse van de mesenteriale lymfklieren in het darmscheil (mesenterium). Ook was vaak het epididymaal vetweefsel aangetast.

Muizen behandeld met Pristane alléén vertoonden 10-20 dagen na behandeling verschillende stadia van peritonitis, met variërende hoeveelheden abdominaal vocht. Microscopisch bleek de milt totaal met tumorcellen geïnfilteerd. De mesenteriale lymfklieren waren geheel tumoreus ontaard, de tumorcellen infiltreerden door het kapsel van de lymfklieren naar het mesenterium. Het epididymale vet was vaak met tumorweefsel geïnfilteerd; mogelijk werd dit wel eens geraakt bij het intraperitoneale inspuiten van de tumorcellen. Micrometastasen werden soms aangetroffen in de lever, de nieren, de bijnieren, het middenrif enz. In hart en longen werden nooit metastasen aangetroffen. Beenmerg werd niet onderzocht.

Sommige, spontaan gestorven, dieren hadden verschijnselen van thrombose (een bekende complicatie bij terminale tumorziekten): haemorrhagische infarcteringen van organen en centrolobulaire levernecrose.

De tumoren vertoonden soms uitgebreide bloedingen en velden necrose. Bij sommige cellijnen treden omvangrijke sarcomateuze tumoren op; men ziet grote, vast aanvoelende tumoren in de omgeving van de lies (uitwendig), in het onderste deel van de buikholte en in het bekken. Hoe deze tumoren ontstaan is niet bekend. Mogelijk is er dan tevens een bindweefselcomponent in het plasmacytoma-inoculaat aanwezig die eveneens tumoreus is ontaard door het plasmacytoma-inducerend agens (een retrovirus). Deze bindweefsel tumoren lijken direct nabij het steekkanaal te groeien, ze verspreiden zich niet door de gehele buikholte. In deze gevallen wordt ook maar weinig ascitesvloeistof gevormd.

5.3 Ongerief

Aan de hand van de klinische waarnemingen en de pathologische bevindingen mag worden aangenomen dat de met hybridoma's geïnoculeerde muizen/ratten chronisch ernstig ongerief ondergaan.

Wanneer men Pristane gebruikt wekt men veelal een peritonitis op, en is het dier al benadeeld vóór het experiment wordt uitgevoerd. De tumormetastasen en de complicaties (peritonitis, infarcten, thrombose, bloedingen en necrose) veroorzaken vrijwel zeker pijn en "malaise gevoel". Het laatste wordt nog

versterkt door de lichamelijke uitputting (cachexie) die veroorzaakt wordt door de anorexie en de tumorgroei zelf, en tevens door de dehydratie veroorzaakt door niet drinken en door vloeistofverlies via de ascitesvloeistof. Benadrukt moet worden dat de handeling van "het verzamelen van ascitesvloeistof" op zich zelf matig ongerief met zich meebrengt, en enige verlichting kan geven. Het ongerief echter waarmee het induceren van ascitesvloeistof gepaard gaat is zeer ernstig en van langere duur: op het moment van verzamelen van buikvocht kunnen de dieren veelal al erg ziek zijn, zoals beschreven in de vorige alinea.

5.4 Aanbevelingen ter vermindering van ongerief

- Monoclonale antilichamen bij voorkeur in vitro bereiden.
- Voor de produktie van ascitesvloeistof dieren ouder dan 6 weken gebruiken. Bij jongere dieren, met name als ze jonger zijn dan 4 weken, slaan de hybrida's vaak niet of moeilijk aan. Bovendien zijn oudere dieren beter bestand tegen de (complicaties van de) ingreep.
- Bij de in vivo bereiding geen Pristane gebruiken.
- Dagelijkse controle van de dieren, liefst twee maal daags, door ervaren medewerkers. De frequentie van de controle verhogen naarmate de dieren langer in experiment zitten.
- Het intraperitoneaal inspuiten van cellen en het verzamelen van ascitesvloeistof moet steriel en lege artis gebeuren, dus door ervaren dierversorgers en biotechnici. Dit om infecties (peritonitis) en bloedingen als gevolg van onverhoopt aanprikken van buikorganen te voorkomen.
- Dieren met sarcomateuze tumoren direct euthanaseren na het vaststellen van de diagnose.
- De buikomvang niet te sterk laten toenemen. Wanneer de produktie van ascitesvloeistof snel op gang komt moet men dus eerder tappen.
- Eénmaal verzamelen heeft voor het individuele dier als voordeel dat het relatief nog in goede conditie is, dat de kans op complicaties (bloedingen, infectie, peritonitis, thrombose, necrose) kleiner is, en dat het ongerief wordt bekort. Bovendien kan men ascitesvocht (en vensus bloed), verzamelen onder algehele narcose waaruit het dier niet meer ontwaakt. Herhaald verzamelen van vloeistof vergroot de kans op complicaties, en versnelt cachexie (de tumorgroei en het ascitesvocht onttrekken water aan de muis/rat).
- Algehele narcose ten behoeve van verzamelen van buikvocht met name ether-narcose, is voor deze relatief kleine ingreep relatief een groot ongerief. Wil men om praktische redenen narcose toepassen (bijv. om te immobiliseren) dan is Fentanyl-Hypnodyl-narcose een bruikbare methode.
- Bij éénmaal verzamelen algehele narcose toepassen, waaruit het dier niet meer ontwaakt.
- [Chronische applicatie van pijnstillers blijkt in de praktijk (nog) niet haalbaar: de dieren eten en drinken niet, ze zouden dus dagelijks enkele malen ingespoten moeten worden, of men zou depotpreparaten moeten toedienen c.q. pellets of minipompjes moeten implanteren. Bovendien is (nog) niet bekend welke pijnstillers in deze gevallen effectief zijn].