



(19)

REPUBLIK

ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer: AT 409 801 B

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 961/2000

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: G01N 33/53

(22) Anmeldetag: 31.05.2000

G01N 33/536

(42) Beginn der Patentdauer: 15.03.2002

(45) Ausgabetag: 25.11.2002

(56) Entgegenhaltungen:

EP 236606A1 EP 177023A2 EP 152254A2  
US 6013532A US 5466574A US 4925788A  
US 4882423A US 4551435A US 4143124A  
WO 99/30151A1 C.A. 114(11)1991:99490S

(73) Patentinhaber:

CISTEM BIOTECHNOLOGIES GMBH  
A-1030 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUM SCREENEN UND ISOLIEREN VON MIKROORGANISMEN, INSbesondere PROKARYONTISCHER UND EUKARYONTISCHER ZELLEN, DIE EIN ANTIGEN PRÄSENTIEREN

AT 409 801 B

(57) Beschrieben ist ein Verfahren zum Screenen und Isolieren von Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, die ein Antigen präsentieren, welches Verfahren durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- das Vorsehen einer Suspension einer Vielzahl lebensfähiger Mikroorganismen, die ein oder mehrere Mikroorganismen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, enthalten, die mindestens eine Art von Antigen an ihrer Oberfläche präsentieren,
- das In-Berührung-Bringen dieser Suspension von Mikroorganismen mit einer Lösung, die Antikörper enthält, welche an die zumindest eine Art von Antigen binden,
- das Inkubieren dieser Suspension mit diesen Antikörpern, um ein Binden der Antikörper an das (die) Antigen(e) zu ermöglichen,
- das In-Berührung-Bringen dieser Suspension von Mikroorganismen mit Antikörper/Antigen-Komplexen an ihrer Oberfläche mit C1q-Molekülen, um eine

Bindung der C1q-Moleküle an die an der Oberfläche befindlichen Antikörper/Antigen-Komplexe zu ermöglichen, und

- das Isolieren lebensfähiger Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer oder eukaryontischer Zellen, die C1q-Moleküle aufweisen, die an einen Antikörper/Antigen-Komplex an ihrer Oberfläche gebunden sind.

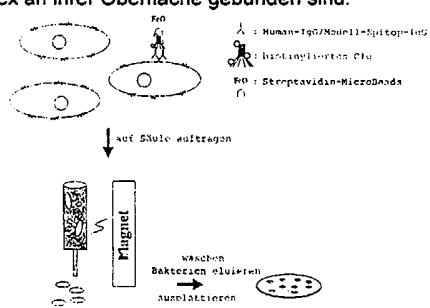


FIG. 2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Screenen und Isolieren von Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, die ein Antigen präsentieren.

Screening-Methoden für Zellen- oder Phagen-Display-Bibliotheken stellen auf dem Gebiet der Genome einen Geschwindigkeits-bestimmenden Engpass dar. Effiziente Methoden zum Sortieren von Zellen sind entweder teuer oder mit dem Risiko verbunden, die Zellen, die gescreent und isoliert werden sollen, zu beschädigen.

Anderseits sind billigere Methoden oft mit hohen Hintergrund-Signalen verbunden, die zu Problemen bei der Detektion von Mikroorganismen (Zellen, Phagen usw.), an welchen ein Interesse besteht, führen. Zumindest führen solche Methoden mit hohen Hintergrund-Signalen zu einem hohen Arbeitsaufwand bei der Analyse positiver Signale mit einer hohen Rate falsch positiver Ergebnisse.

Die Identifizierung von Organismen, an welchen ein Interesse besteht, mit Antikörpern ist ein allgemeines Verfahren bei solchen Screening-Systemen sowie bei der Identifizierung, Trennung, Züchtung und Manipulation solcher Mikroorganismen.

Beispielsweise ist es bekannt, dass die Markierung einer Ziel-Entität mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern (MABs) oder Antikörpern, die mit Färbereagenzien verbunden sind, ein Selektionsmittel zur Identifizierung von Ziel-Zellen ist. Wenn jedoch eine solche Identifizierung manuell oder mechanisch vorgenommen wird, müssen zahlreiche Tätigkeiten, die Inkubationen und Waschschritte mit umfassen, durchgeführt werden. Anstelle einer solchen direkten Markierung mit monoklonalen Antikörpern ist eine indirekte Analyse üblich, bei welcher die biologischen Ziel-Mikroorganismen zuerst mit einem spezifischen MAB markiert werden, welcher nicht markiert ist. Nach ausgiebigem Waschen zum Entfernen von ungebundenem spezifischen MAB wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der markiert ist und den ersten Antikörper erkennt. Obwohl jedoch solche indirekte Methoden noch spezifischer sind, erfordern sie beträchtliche Mengen an Reagenzien und zahlreiche Tätigkeiten, die bei solchen Identifizierungsprozessen angewendet werden.

Es wurde vorgeschlagen, magnetische Teilchen zu verwenden, die einen Antikörper an ihre Oberfläche gebunden haben, welcher an spezifische Proteine oder Antigene binden kann (US 5,466,574 und US 6,013,532). Es wurde auch vorgeschlagen, dass dieses Verfahren zur Trennung von Zellen, Zellkomponenten oder Viren mit einer charakteristischen Determinante aus einer Testprobe verwendet wird, z.B. zum Entfernen seltener Zellen, zur Abreicherung natürlicher Killer-Zellen, zur Bestimmung von Reticulozyten, für Phagozytose-Tests, für Obsonisierungsuntersuchungen, zur Detektion spezifischer Tumorzellen oder zur immunspezifischen Isolierung von Monozyten, Granulozyten oder anderen Zelltypen. Bisher wurde noch nicht vorgeschlagen, ein solches System spezifisch zum Screenen und Isolieren lebensfähiger prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, beispielsweise aus einer Bibliothek von Zellen, die eine Bibliothek von Antigenen innerhalb eines Membranproteins aufweisen, zu verwenden. Tatsächlich wird die Lebensfähigkeit der Zellen bei den Methoden des Standes der Technik häufig während der Screening- und Isolierungsvorgänge gemäß einem solchen Stand der Technik stark verringert. Daraus ergibt sich, dass eine große Anzahl von Ziel-Mikroorganismen während solcher Vorgangsweisen verloren geht oder getötet wird.

C1q ist ein Plasmaprotein, das ständig in relativ hoher Konzentration (70 bis 80 mg/l) anwesend ist und Teil des klassischen Weges der Komplement-Aktivierung ist. Das C1q-Protein-Molekül weist 6 kugelförmige "Köpfe" auf, von welchen jeder eine A-, B- und C-Polypeptidkette enthält und eine 81-Reste-Verlängerung trägt, die Teil eines zentralen, Kollagen-artigen Tripel-Helix-Schwanzes ist (Eggleton et al., Trends in CELL BIOL. 8 (1998), S. 428-431). Es ist bekannt, dass C1q an erster Stelle an ein Antigen bindet, gefolgt von der Bindung von C1s und C1r an C1q (wodurch der C1-Komponenten-Komplex gebildet wird), gefolgt von einer seriellen Bindung der anderen Komplement-Komponenten C2-C9). C1q bindet an eine Reihe verschiedener Zelltypen, wodurch eine Anzahl verschiedener Immunantworten und Entzündungsreaktionen ausgelöst wird. Es ist beschrieben, dass die Wechselwirkungen von C1q mit humanen Neutrophilen, Eosinophilen, Blutplättchen, Endothelzellen und B-Lymphozyten entzündliche Reaktionen und adaptive Immunantworten beeinflussen. Es ist auch beschrieben, dass C1q eine Anzahl verschiedener Funktionen in Fibroblasten moduliert.

Eine der wichtigeren biologischen Rollen von C1q ist die Erkennung von Antigen/Antikörper-Komplexen. C1q bindet an solche Komplexe, wenn ein Antigen an der äußeren Oberflächenmembran eines pathogenen Bakteriums von einem Antikörper erkannt wird. Wenn C1q an solche

5 Immunkomplexe bindet, führt die Aktivierung der anderen Komponenten-Faktoren durch diesen Bindungsvorgang zu einem Enzymkomplex an der Bakterienmembran, der zu einem Angriff und der Perforierung der Bakterienzellwand (Membran) und zur Lyse des Bakteriums führt. Obwohl von C1q bekannt ist, dass es für Antikörper/Antigen-Immunkomplexe hoch spezifisch ist und es auch in 10 Substanz-konjugierter Form zur Bestimmung oder Detektion eines spezifischen Antigens in einer Körperflüssigkeit oder in anderen biologischen Flüssigkeiten verwendet wurde, wurde noch nie vorgeschlagen, C1q bei einem Verfahren zum Isolieren lebensfähiger prokaryontischer und eukaryontischer Zellen einzusetzen. Auf der Ebene der Zelldetektion wurden C1q oder C1q-Reagenzien verwendet, damit sie an fixierte und immobilisierte Zellen binden, um Oberflächen-Antigen oder 15 intrazelluläre Substanzen von Mikroorganismen chemisch zu messen (vgl. US 4,882,423).

10 Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Selektion und Isolierung lebensfähiger Mikroorganismen, insbesondere lebensfähiger prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, die ein Antigen präsentieren, vorzusehen, welches billig, einfach zu handhaben und hochselektiv ist, wenig Hintergrund hat und keine negativen Auswirkungen auf die Mikroorganismen, 15 vorzugsweise zu selektierende Zellen, hat und daher zum Screenen großer Bibliotheken anwendbar ist, welche nur ein einziges oder ein paar Ziele, woran ein Interesse besteht, aufweisen.

15 Außerdem ist es ein Ziel, ein solches Screening- und Isoliersystem insbesondere für Zellbibliotheken vorzusehen, die eine Bibliothek von Antigenen in einer Außenmembran-Display-Verbindung aufweisen und wobei die Erkennung des Antigens selbst dann möglich ist, wenn es als Insert in 20 einem solchen Außenmembran-Protein präsentiert ist.

20 Diese Aufgaben werden durch ein Verfahren zum Screenen und Isolieren von Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, die ein Antigen aufweisen, gelöst, welches durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- 25 - das Vorsehen einer Suspension einer Vielzahl lebensfähiger Mikroorganismen, die ein oder mehrere Mikroorganismen, insbesondere prokaryontische und eukaryontische Zellen, enthalten, die mindestens eine Art von Antigen an ihrer Oberfläche präsentieren,
- das In-Berührung-Bringen dieser Suspension von Mikroorganismen mit einer Lösung, die Antikörper enthält, welche an die zumindest eine Art von Antigen binden,
- das Inkubieren dieser Suspension mit diesen Antikörpern, um ein Binden der Antikörper an 30 das (die) Antigen(e) zu ermöglichen,
- das In-Berührung-Bringen dieser Suspension von Mikroorganismen mit Antikörper/Antigen-Komplexen an ihrer Oberfläche mit C1q-Molekülen, um eine Bindung der C1q-Moleküle an die an der Oberfläche befindlichen Antikörper/Antigen-Komplexe zu ermöglichen, und
- das Isolieren lebensfähiger Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, die C1q-Moleküle aufweisen, die an einen Antikörper/Antigen-Komplex an 35 ihrer Oberfläche gebunden sind.

40 Es war überraschend, dass mit der Verwendung von C1q-Molekülen ein schnelles und einfaches sowie kostengünstiges Verfahren zum Screenen, Selektieren und Isolieren lebensfähiger Mikroorganismen, insbesondere fragiler prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, vorgesehen werden konnte. Obwohl man vom Komplement weiß, dass es Zellen, die einen Antigen/Antikörper-Komplex an ihrer Oberfläche präsentieren, schwer schädigt und es deshalb bisher nur in Verbindung mit Nekrochemie verwendet wurde (z.B. US 4,882,423), zeigte es sich im Verlauf der vorliegenden Erfindung, dass die Verwendung der C1q-Moleküle und -Reagenzien zum Screenen und Isolieren lebensfähiger Zellen durchführbar ist, ohne zu riskieren, seltene oder fragile Zellen infolge 45 von Problemen mit der Lebensfähigkeit in Verbindung mit dem Screening-Verfahren zu verlieren.

45 Außerdem haben C1q-Moleküle einen weiteren Vorteil im Vergleich zu einem sekundären Antikörper, weil solche C1q-Moleküle selektiv an IgGs der Unterklassen IgG3 und IgG1, aber mit geringerer Affinität an IgG2 und IgG4 binden. Daher kann man Epitope spezifisch isolieren, die eine Komplement-vermittelte Lyse bewirken könnten.

50 Gemäß bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung weist die Suspension der Vielzahl lebensfähiger Mikroorganismen eine Bibliothek von Mikroorganismen auf, worin jeder einzelne Mikroorganismus mindestens ein uniktes Antigen präsentiert, das für die Mehrheit der Vielzahl an Mikroorganismen nicht üblich ist. Dieses Antigen oder diese Bibliothek von Antigenen kann vorzugsweise von pathogenen Organismen abstammen, z.B. von einer genetischen Bibliothek eines solchen Mikroorganismus. Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform kann ein

solches Antigen ein randomisiertes Peptid, beispielsweise von randomisierten DNA-Sequenzen generiert (Grabowska et al., *Virology* 269 (2000), 47-53; Rowley et al., *J. Immunol.* 164 (2000), 3413-3419) sein. Eine andere bevorzugte Alternative ist die Präsentation von "expressed sequence tags" (ESTs), vorzugsweise von ESTs, die von spezifischen EST-Bibliotheken mit bekannter Spezifität stammen, z.B. von spezifischen Organismen oder spezifischen Zelltypen.

Solche Mikroorganismen, in welchen heterologe Antigene präsentiert sind, werden durch normale Screening-Methoden wegen ihrer erhöhten Fragilität, insbesondere in Bezug auf ihre Membran-Stabilität, sogar noch stärker gefährdet. Daher ist es sogar noch überraschender, dass beim vorliegenden C1q-System die Anzahl der lebensfähigen Zellen sogar für ein Screenen auf einzelne oder seltene Zellen/Antigene hoch genug ist.

Bevorzugte Zellen, die zur Präsentation von Antigenen gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind prokaryontische und eukaryontische Zellen, die im Labor unter herkömmlichen Bedingungen leicht zu handhaben sind. Insbesondere Zellen mit etablierten Techniken zur Genmanipulation sind bevorzugt.

Wie oben festgestellt, wird bevorzugt, dass das (die) zu präsentierende(n) und an die Antikörper zu bindende(n) Antigen(e) für die Mikroorganismen heterolog ist (sind), d.h., dass das Antigen nicht im Wildtyp von solchen Mikroorganismen vorhanden ist (beispielsweise solche Mikroorganismen genetisch modifiziert).

Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform weist die Antikörper enthaltende Lösung mehr als eine einzige Antikörperspezies auf. Das erfindungsgemäße Verfahren ist zum Screenen einer gemischten Antikörperlösung geeignet, die beispielsweise aus menschlichem oder tierischem Serum stammt, das absichtlich in Bezug auf ein spezifisches Antigen oder eine ganze Antigen-Bibliothek gezogen oder auf andere Weise verursacht wurde (z.B. durch spezifische Plasmaselektion). Dadurch ist das vorliegende System perfekt für ein Klonierungssystem, wie in WO 99/30151 beschrieben, geeignet.

Bevorzugte Antikörperlösungen sind daher Antikörper-Präparationen (insbesondere IgG-Präparationen), die aus menschlichem Blut stammen, insbesondere von Patienten mit Antikörpern gegen das Pathogen der Antigen-Bibliothek, auf die gescreent werden soll. Besonders geeignet sind Hyperimmunoglobulin-Präparationen von beispielsweise HAV-, HBV-, HCV-, HIV-Patienten oder von Patienten, die Infektionen mit beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *P.aeruginosa* oder *Chlamydia pneumoniae*, oder andere klinisch relevante Infektionen mit viralen, prokaryontischen oder eukaryontischen Pathogenen überstanden haben.

Wenn eine Antigen-Bibliothek in einem oder angrenzend an ein Oberflächenprotein eines Mikroorganismus, z.B. eines Bakteriums, wie *E. coli*, präsentiert wird, kann es oft schwierig sein, einen Komplex aus einem Antigen, einem Antikörper und einem C1q-Molekül zu bilden, insbesondere, wenn das Antigen in einer ziemlich unnatürlichen Umgebung präsentiert wird. Anderseits würde, wenn solch ein Immunkomplex oder die Detektion eines solchen Immunkomplexes bewirken würde, dass der Immunkomplex die Zellwand schädigt oder zerreißt, die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen schwer gefährdet. Tatsächlich war es überraschend, dass das Screenen, die Detektion und das Isolieren mit C1q-Molekülen sogar bei Antigenen möglich war, die als integraler Teil des Oberflächenproteins der Mikroorganismen präsentiert wurden, insbesondere in jenen Fällen, wo dieses Antigen als integraler Teil des Außenmembranproteins präsentiert wird (wie z.B. in WO 99/30151 beschrieben).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das bei der vorliegenden Erfindung verwendete C1q-Molekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus C1q, Substanz-konjugiertem C1q, synthetischem C1q-Peptid, Oberflächen-gebundenem C1q oder Mischungen solcher Komponenten. Insbesondere wird C1q, das mit spezifischen Marker-Substanzen konjugiert ist, bevorzugt. Solche Marker-Substanzen können Signal-aussendende Substanzen sein, wie Enzymsubstrate, Farbstoffe oder Pigmente, magnetisierbare Substanzen, Spender oder Akzeptoren für Elektronenübertragung, radioaktive Materialien, Metallverbindungen und Metallzusammensetzungen, die Signale aussenden, welche von den Sensororganen oder einem Außeninstrument detektierbar sind, Enzyme oder Coenzyme, die zur Aussendung detektierbarer Signale modifiziert werden können, Biotinylierung, Agglutinierungssubstanzen, die zusammenkommen, um dadurch leicht detektiert zu werden, Zelfunktions-regulierende Substanzen, beispielsweise bestimmte Enzyme, die auf die Gegensub-

stanzen wirken, welche mit C1q konjugiert sind, um letzteren irgendwelche Funktionen zu verleihen, und Substanzen, wie hochpolymere Materialien, die die mit C1q konjugierten Antigene fangen oder reversibel fixieren. C1q kann aus verschiedenen Tieren, einschließlich Schafen, Kaninchen, Meerschweinchen, Rindern, Pferden, Hunden, Mäusen und den Menschen isoliert werden und mittels herkömmlicher Reinigungsvorgänge hergestellt werden. Es ist auch möglich, synthetische C1q-Peptide zu verwenden, die den wesentlichen Teil für Immunkomplex-Erkennung und -Bindung enthalten. Beispiele für solche C1q-Moleküle, insbesondere Substanz- oder Oberflächen- gebundene C1qs, sind dem Fachmann im Prinzip bekannt und beispielsweise in US 4,882,423 und 4,143,124 beschrieben.

5 Gemäß bevorzugten Ausführungsformen ist das C1q-Molekül auf einer festen Matrix, insbesondere auf magnetischen Teilchen, immobilisiert, und sind die Mikroorganismen, an welchen ein Interesse besteht, durch Affinitätsreinigung unter Verwendung solcher magnetischer Teilchen gereinigt. Es war überraschend, dass dieses Verfahren zum Isolieren lebensfähiger Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, geeignet ist, die gegebenenfalls 10 in Bezug auf ihre Oberflächenproteine genetisch manipuliert sind. Obwohl die magnetische Immobilisierung und Manipulation von Zellen im Prinzip bekannt ist (vgl. z.B. US 6,013,532), ist es jedoch bekannt, dass bei solchen Tätigkeiten normalerweise eine große Anzahl von Ziel-Mikroorganismen verloren geht oder getötet wird. Außerdem wurden solche magnetische Verfahren nur bei normalen, nicht-manipulierten oder fragilen Zellen angewendet, und niemals in Verbindung mit 15 dem Komplement-System, von welchem bekannt ist, dass es eine starke Auswirkung auf die 20 Integrität der Oberfläche solcher Mikroorganismen und ihre Lebensfähigkeit hat.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Kultur von Mikroorganismen, die ein Antigen präsentieren, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass die erfindungsgemäß isolierten Mikroorganismen, die durch das vorliegende Verfahren 25 identifiziert werden, gegebenenfalls von den Antikörpern und der C1q Molekülen getrennt werden, geklont werden und gegebenenfalls in einem geeigneten Wachstumsmedium gezüchtet werden, beispielsweise um den Antigen- oder Immunkomplex zu identifizieren.

Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Set zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend

30 - eine Suspension einer Mehrzahl lebensfähiger Mikroorganismen, die ein oder mehrere Mikroorganismen enthalten, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, welche mindestens eine Antigen-Art an ihrer Oberfläche aufweisen,  
 - eine Suspension von Antikörpern, welche an die mindestens eine Antigen-Art binden, und  
 - mindestens eine C1q-Molekül-Art.

35 Die drei Mindest-Komponenten des Sets gemäß der vorliegenden Erfindung können an die spezifischen, oben beschriebenen Ausführungsformen angepasst werden und gegebenenfalls in lyophilisierter Form und/oder zusammen mit geeigneten Hilfsstoffen vorliegen. Vorzugsweise sind auch weitere Reagenzien oder Einrichtungen zum Isolieren der Zellen im Set inkludiert, z.B. Vorrichtungen zur magnetischen Trennung von Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und 40 eukaryontischer Zellen.

45 Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung zur Identifizierung und Isolierung von Antigenen, insbesondere Antigenen, die aus pathogenen Organismen stammen, um Vakzinen vorzusehen.

Das Verfahren ist im Beispiel und in den Zeichnungsfiguren weiter beschrieben, ohne auf diese 50 eingeschränkt zu sein.

Fig. 1 und Fig. 2 zeigen die C1q-vermittelte Ganzzellen-Affinitätsreinigung.

### B e i s p i e l

50 **C1q kann Bakterien, die ein spezifisches Epitop (T7-Epitop) präsentieren, speziell isolieren:**

#### Versuchsvorgang:

55 Einzelne Kolonien von DH5 $\alpha$ -Zellen, die das Plasmid pEH1-LamBT7 oder das Plasmid pEH3 (nur den Vektor) enthalten, welche in 5 ml LB<sub>Kan</sub> bzw. LB<sub>Chl</sub> suspendiert waren, wurden etwa 4 h

lang bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 wurden die Zellen mit 0,1 mM IPTG 1,5 h lang bei 37°C induziert. Eine Mischung von mit T7-Epitop-markiertem LamB exprimierenden Zellen und nicht-Epitop-exprimierenden Zellen (Verhältnis = 10<sup>2</sup> : 10<sup>6</sup>) wurde mit 10 ng T7-spezifischem Antikörper entweder mit oder ohne 10 µg Human-IgGs (zuvor an *E. coli* DH5α voradsorbiert) inkubiert.

5 Das Reaktionsvolumen war 100 µl (Puffer: 25 mM HEPES-Cl, pH 7,4, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% BSA), die Inkubationstemperatur betrug 4°C, die Röhrchen wurden auf eine Schüttelvorrichtung gegeben (Rotator Drive STR4, Stuart Scientific).

10 Nach der Inkubation mit 5 µg biotinyliertem C1q wurde 1 ml HEPES-Puffer zugegeben, und die Eppendorf-Röhrchen wurden 15 min lang bei 4°C (8.000 U/min, Biofuge, Heraeus) zentrifugiert, das Zell-Pellet wurde noch einmal mit 1 ml frischem Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen in 100 µl Puffer resuspendiert, und 10 µl Streptavidin-gekoppelte MicroBeads (Miltenyi) wurden zugegeben.

15 Nach 50 min wurde die Inkubationsmischung mit 1,5 ml HEPES verdünnt und auf MS-Säulen (Miltenyi) geladen. Nach dem Waschen (3 x 1 ml Puffer) wurde die Säule vom Magnet genommen, und die gebundenen Zellen wurden mit 1,5 ml Puffer eluiert. Danach wurde die Elutionsfraktion noch einmal auf eine MS-Säule für eine zweite Trenn-Runde geladen (die Wasch- und Elutionsvolumina waren 3 x 1 ml bzw. 1,5 ml).

20 Inkubationszeit: t7-Monoklonaler Antikörper: 1 h lang, biotinyliertes C1q: über Nacht (16 h), 50 min mit MicroBeads, die mit Streptavidin konjugiert waren.

25 Die Fraktionen 1 + 2, 3 + 4 und 5 + 6 wurden gepoolt, und die Hälfte des Volumens wurde auf LB-Platten plattiert, die entweder Kanamycin oder Chloramphenicol enthielten.

Ergebnis: Anzahl von Zellen, die beim Versuch verwendet wurden (*E. coli* Stamm DH5α)

LamB T7 (Kanamycin-Resistenz): 67

pEH3 (nur Vektor) (Chloramphenicol-Resistenz): 1,5 x 10<sup>5</sup>

25

C1q (µg)	5	5	5	5
Human-IgGs (µg)	10	10	10	10
T7-Ab (ng)	10	10	-	-
Waschung 1 (MS) spezifisch	4	7	51	44
Waschung 2 (MS) spezifisch	9	2	0	0
Elution spezifisch		36		0
unspezifisch		<10		<10

35

### Tabelle 1

40 Diese Ergebnisse zeigen, dass C1q-Bakterien, die ein spezifisches Epitop (T7-Epitop) an der Oberfläche präsentieren, aus einer Vielzahl von Bakterien, die dieses Epitop nicht präsentieren, isolieren kann. Nach einer einzigen Trenn-Runde wurden mehr als 50% positive Bakterien mit einem Hintergrund von nur 10-20 Zellen (aus 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen !) gewonnen. Bei einem direkten Vergleich führte der sekundäre Antikörper, der anstelle von C1q verwendet wurde, zu einem viel höheren Hintergrund von 300-500 Zellen, die kein Epitop präsentierten.

45 Wie aus dem vorliegenden Beispiel ersichtlich, funktioniert C1q derzeit am besten mit LamB-Außenmembranprotein oder ähnlichen Proteinen, das (die) an der Oberfläche ein Homotrimer bildet (bilden). Wenn man daher ein heterologes Peptid in eine der Loops insertiert, wird dieses Epitop drei Mal sehr nahe an einander präsentiert. Dies wird natürlich für eine effiziente C1q-Bindung bevorzugt, da eine starke Bindung nur auftritt, wenn C1q an mindestens zwei Antigen-gebundene IgGs gleichzeitig bindet.

50

### **PATENTANSPRÜCHE:**

- 55 1. Verfahren zum Screenen und Isolieren von Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, die ein Antigen präsentieren, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- das Vorsehen einer Suspension einer Vielzahl lebensfähiger Mikroorganismen, die ein oder mehrere Mikroorganismen, insbesondere prokaryontische und eukaryontische Zellen, enthalten, die mindestens eine Art von Antigen an ihrer Oberfläche präsentieren,
  - das In-Berührung-Bringen dieser Suspension von Mikroorganismen mit einer Lösung, die Antikörper enthält, welche an die zumindest eine Art von Antigen binden,
  - das Inkubieren dieser Suspension mit diesen Antikörpern, um ein Binden der Antikörper an das (die) Antigen(e) zu ermöglichen,
  - das In-Berührung-Bringen dieser Suspension von Mikroorganismen mit Antikörper/Antigen-Komplexen an ihrer Oberfläche mit C1q-Molekülen, um eine Bindung der C1q-Moleküle an die an der Oberfläche befindlichen Antikörper/Antigen-Komplexe zu ermöglichen, und
  - das Isolieren lebensfähiger Mikroorganismen, insbesondere prokaryontischer und eukaryontischer Zellen, die C1q-Moleküle aufweisen, die an einen Antikörper/Antigen-Komplex an ihrer Oberfläche gebunden sind.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Suspension einer Vielzahl lebensfähiger Mikroorganismen eine Bibliothek von Mikroorganismen aufweist, worin jeder einzelne Mikroorganismus mindestens ein uniktes Antigen präsentiert, das die Mehrheit der Vielzahl von Mikroorganismen nicht hat.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen genetisch modifiziert sind und die mindestens eine Antigen-Art, die an diese Antikörper bindet, im Wildtyp der Mikroorganismen nicht vorhanden ist.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die die Antikörper enthaltende Lösung mehr als eine Antikörper-Spezies aufweist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen als integraler Teil eines Oberflächenproteins dieser Mikroorganismus präsentiert ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen Bakterien sind und das Antigen als integraler Teil eines Außenmembranproteins präsentiert ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörperlösung eine IgG-Lösung ist, die aus Blutplasma stammt.
- 30 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein randomisiertes Peptid ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Antigen ein Peptid ist, das von einem pathogenen Mikroorganismus stammt.
- 35 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das C1q-Molekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus C1q, Substanz-konjugiertem C1q, synthetischem C1q-Peptid, Oberflächen-gebundenem C1q oder Mischungen davon.
11. Verfahren zur Herstellung einer Kultur von Mikroorganismen, die ein Antigen präsentieren, dadurch gekennzeichnet, dass die gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 isolierten Mikroorganismen gegebenenfalls von den Antikörpern und den C1q-Molekülen getrennt werden, kloniert und gegebenenfalls in einem geeigneten Wachstumsmedium gezüchtet werden.
- 40 12. Set zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend eine Suspension einer Mehrzahl lebensfähiger Mikroorganismen, die eine oder mehrere Mikroorganismen enthalten, insbesondere prokaryontische und eukaryontische Zellen, welche mindestens eine Antigen-Art an ihrer Oberfläche aufweisen, eine Suspension von Antikörpern, welche an die mindestens eine Antigen-Art binden, und mindestens eine C1q-Molekül-Art.
- 45 13. Verwendung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 11 zur Identifizierung und Isolierung von Antigenen.

50

## HIEZU 2 BLATT ZEICHNUNGEN

55

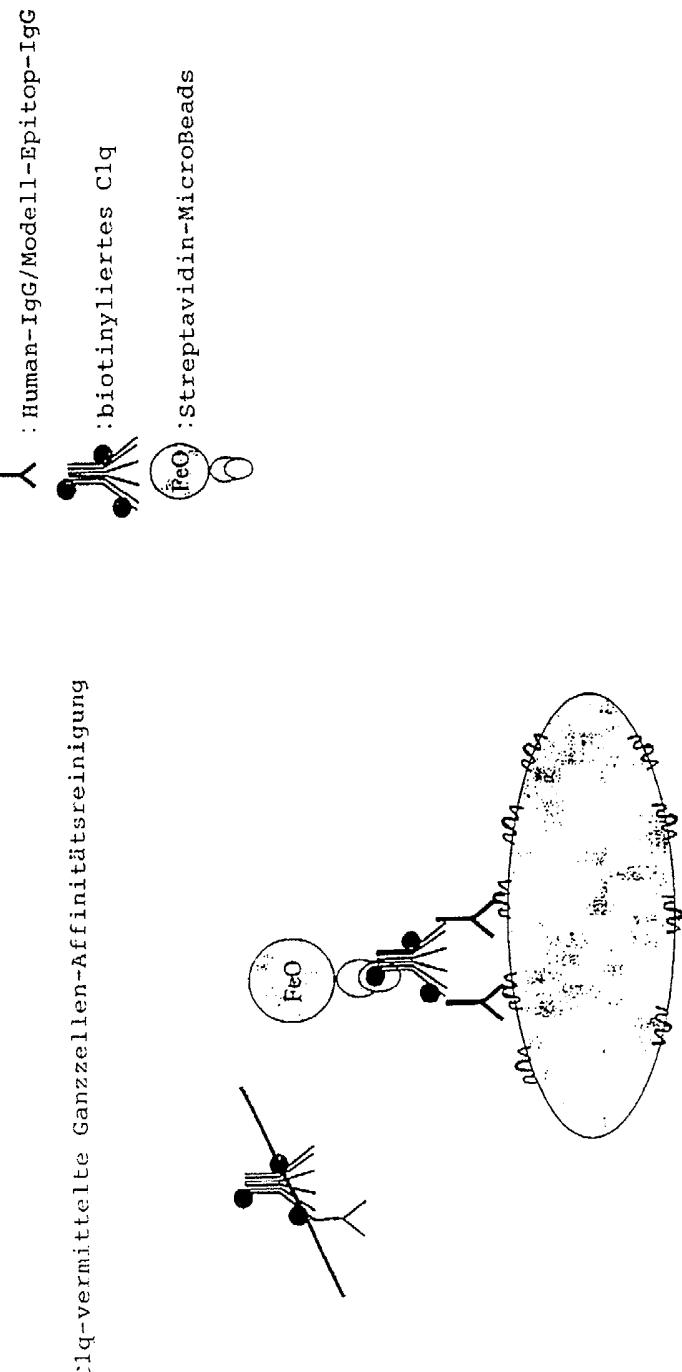


FIG. 1

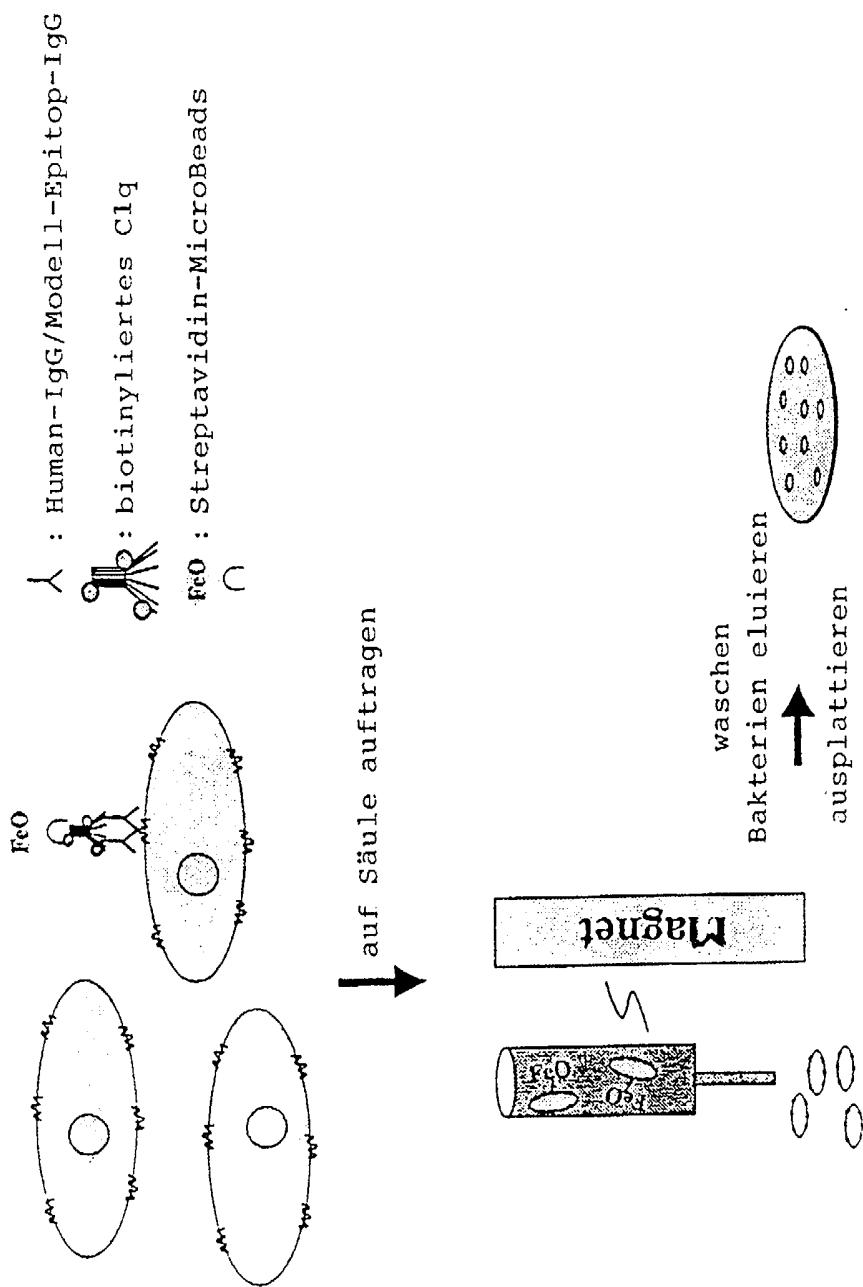


FIG. 2