

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
16 mars 2006 (16.03.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/027431 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/195
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/001549
- (22) Date de dépôt international : 21 juin 2005 (21.06.2005)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0408714 6 août 2004 (06.08.2004) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **ABAG Société Anonyme** [FR/FR]; 17, avenue du Parc, Technopolis, F-91380 Chilly Mazarin (FR). **UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1** [FR/FR]; Etablissement public à Caractères Scientifique, Culturel et Professionnel, 43, boulevard du 11 novembre 1918, F-69100 Villeurbanne (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ARIE, Jean-Philippe** [FR/FR]; 65/67, rue Brillat Savarin, F-75013 Paris (FR). **CYNCYNATUS, Camille** [FR/FR]; 72, rue de l'Amiral Roussin, F-75015 Paris (FR).
- (74) Mandataire : **SAUVAGE, Renée**; Cabinet Sauvage, 65, boulevard Soult, F-75012 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL PROTEINS WHICH CAN BE USED, FOR EXAMPLE, FOR THE <I>IN VITRO</I> ISOLATION AND PREVENTION OF <I>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</I> INFECTIONS

(54) Titre : NOUVELLES PROTEINES PERMETTANT, NOTAMMENT, LA MISE EN EVIDENCE IN VITRO ET LA PREVENTION DES INFECTIONS A LEGIONELLA PNEUMOPHILA

(57) Abstract: The invention relates to novel polynucleotides, comprising sequence ID SEQ N°1 or parts or variants of said sequence, novel polypeptides encoded by said polynucleotides, expression vectors comprising said polynucleotides and host cells comprising said expression vectors. Said polynucleotides and polypeptides can be used in the field of *in vitro* diagnosis and/or for production of vaccines against *Legionella pneumophila*.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet de nouveaux polynucléotides, comprenant la séquence ID SEQ N°1 ou des parties ou des variants de ladite séquence, de nouveaux polypeptides codés par ces polynucléotides, des vecteurs d'expression comprenant lesdits polynucléotides et des cellules hôtes comprenant lesdits vecteurs d'expression. Ces polynucléotides et ces polypeptides sont utilisables dans le domaine du diagnostic *in vitro* et/ou la production de vaccins contre *Legionella pneumophila*.

WO 2006/027431 A1

Nouvelles protéines permettant, notamment, la mise en évidence *in vitro* et la prévention des infections à *Legionella pneumophila*.

La présente invention concerne l'identification de
5 nouveaux polynucléotides et polypeptides, leur production et leur utilisation dans le domaine du diagnostic et/ou la production de vaccins contre *Legionella pneumophila*.

Les légionelloses sont des infections respiratoires sévères résultant de l'inhalation d'aérosols contaminés par
10 des bactéries à croissance intracellulaire du genre *Legionella*, et qui se manifestent sous forme sporadique ou épidémique. Ces infections surviennent aussi bien en ville (infections communautaires) qu'en milieu hospitalier (infections nosocomiales). *Legionella pneumophila* est
15 responsable de 95% de l'ensemble des cas de légionellose.

Les légionelloses se présentent principalement comme des infections pulmonaires aiguës. Elles se caractérisent par la sévérité du tableau clinique : après une incubation de 2 à 10 jours et un début pseudo-grippal, le malade
20 présente une température élevée, un malaise général, des douleurs abdominales, voire des troubles psychiques. L'atteinte radiologique est souvent bilatérale. La mortalité associée, particulièrement élevée chez certaines personnes dites à risque (sujets âgés ou souffrant d'un
25 cancer, d'une hémopathie), varie de 10 à 20% (13% des 835 cas recensés en France en 2002).

Il est essentiel de pouvoir poser précocement le diagnostic de légionellose du fait de l'enjeu thérapeutique : en effet, les légionelles sont insensibles
30 aux bêta-lactamines - qui sont les principaux antibiotiques prescrits en cas de pneumopathie - et il faut avoir recours à un traitement spécifique reposant sur les macrolides (érythromycine) ou les fluoroquinolones.

A l'heure actuelle, le diagnostic est réalisé par
35 trois méthodes générales : la mise en évidence des bactéries à partir de prélèvements broncho-pulmonaires (soit directement par immunofluorescence soit par culture

sur milieux sélectifs) ; la détection d'antigènes urinaires spécifiques ; la mise en évidence d'une augmentation significative du titre des anticorps dans le sérum (sérologie).

5 L'examen direct des prélèvements réalisé par microscopie à fluorescence se pratique, pour la majorité des réactifs commercialisés, à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux qui reconnaissent l'ensemble des sérogroupes connus de *L. pneumophila*. Le principal
10 inconvénient de cette technique est sa faible sensibilité. Sa spécificité est également imparfaite (~90%), du fait de réactions immunologiques croisées avec certaines bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertusis* ou *Bacteroides fragilis*. La culture sur milieux spécifiques
15 est la méthode de choix, notamment dans un but épidémiologique (typage des souches), mais donne des résultats tardifs puisque les légionelles cultivent en 3 à 4 jours, voire plus.

Les tests urinaires sont rapides et très spécifiques.
20 Néanmoins, leur sensibilité est très variable, de 50-90% ; cette forte variabilité est liée non seulement aux caractéristiques du patient mais aussi au fait que les tests actuels permettent seulement la détection de *L. pneumophila* séro groupe 1. Enfin, en présence d'une
25 recherche positive d'antigènes urinaires de légionelles, il est indispensable de réaliser en parallèle une culture de prélèvements respiratoires pour l'isolement de la bactérie.

Le sérodiagnostic est tout particulièrement utile chez les patients qui ne produisent pas d'expectoration et
30 en cas d'enquête épidémiologique. Il repose sur la mise en évidence d'une augmentation significative du taux des anticorps entre un sérum précoce et un sérum prélevé 4 à 6 semaines plus tard. Environ 30% des cas de légionellose sont identifiées par cette méthode à l'heure actuelle.
35 Néanmoins, les antigènes utilisés dans les tests actuels sont constitués de simples extraits préparés directement à partir de culture de légionelles inactivées par la chaleur

ou après ensemencement des bactéries dans le sac vitellin d'œufs embryonnés. Les anticorps détectés reconnaissent en majorité des déterminants du lipopolysaccharide (LPS), qui peuvent être proches de déterminants du LPS d'autres bactéries et provoquer des réactions croisées. De fait, des réactions de ce type ont été décrites avec d'autres bactéries Gram négatives tels que *Pseudomonas sp.*, *Bacteroides sp.*, *Bordetella sp.* et certaines entérobactéries. Enfin, la plupart des tests actuels permettent seulement la détection des anticorps de type IgG, ce qui nécessite deux prises de sang à 4-6 semaines d'intervalle pour faire un diagnostic d'infection récente.

En résumé, les pratiques courantes ne répondent toujours pas aux attentes médicales pour établir le diagnostic précoce des légionelloses. En particulier, les tests sérologiques actuels reposent sur des méthodes de détection anciennes, non automatisables, ou utilisent des antigènes non caractérisés («soupes antigéniques»), dont la spécificité et la sensibilité sont peu satisfaisantes. La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) est la technique la plus employée pour le diagnostic sérologique (McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA et Dowdle WR (1977), *Legionnaires' disease : isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease*, N Engl J Med. 297 (22) : 1197-203). Environ 70% des diagnostics au niveau européen sont réalisés par cette méthode. Il existe pourtant de très grandes variations selon les malades : ainsi pour un titre élevé précoce, la sensibilité est basse et la valeur prédictive est très faible (de l'ordre de 10-15% seulement) (Jarraud S, Reyrolle M et Etienne J. dans Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, *Précis de bactériologie clinique*, ed. ESKA, Paris, 2000).

Aucune technique de sérodiagnostic n'utilise donc actuellement d'antigènes purifiés spécifiques de *L. pneumophila*, et ne permet un diagnostic précoce de l'infection.

La protéine appelée 2A1, de séquence polypeptidique ID SEQ N°2, identifiée à partir du génome de *Legionella pneumophila*, est une protéine n'ayant ni homologue ni fonction connus.

5 Les inventeurs de la présente invention ont identifié de nouveaux polynucléotides et de nouveaux polypeptides dont les utilisations possibles sont décrites ci-après.

Définitions

10 Les définitions suivantes sont données afin de faciliter la compréhension de certains termes utilisés dans cette description.

On entend par "polynucléotide", un polyribonucléotide ou un polydésoxyribonucléotide qui peut être un ADN ou un ARN modifié ou non.

15 Le terme polynucléotide inclut, sans limitation, un ADN simple brin ou double brin, un ADN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brin, un ADN qui est un mélange de régions simple brin, double brin et/ou triple brin, un
20 ARN simple brin ou double brin, un ARN composé d'un mélange d'une ou plusieurs région(s) simple brin et d'une ou plusieurs région(s) double brin et les molécules hybrides comprenant un ADN et un ARN qui peuvent comprendre des régions simple brin, double brin et/ou triple brin ou un
25 mélange de régions simple brin et double brin. Le terme polynucléotide peut aussi comprendre un ARN et/ou un ADN comprenant une ou plusieurs régions triple brin. Les brins dans de telles régions peuvent provenir de la même molécule ou de molécules différentes. Par conséquent les ADN ou ARN,
30 ayant des squelettes modifiés pour la stabilité ou d'autres raisons, sont inclus dans le terme polynucléotides. On entend également par polynucléotide, les ADNs et ARNs contenant une ou plusieurs bases modifiées. On entend par base modifiée, par exemple, les bases inhabituelles telles que l'inosine. Le terme polynucléotide vise également les
35 polynucléotides de forme modifiée chimiquement, enzymatiquement ou métaboliquement. Les polynucléotides

comprennent également les polynucléotides courts tels que les oligonucléotides.

On entend par "polypeptide", un peptide, un oligopeptide, un oligomère ou une protéine comprenant au moins deux acides aminés joints l'un à l'autre par une liaison peptidique normale ou modifiée.

Le terme polypeptide comprend les chaînes courtes, appelées peptides, oligopeptides et oligomères, et les chaînes longues, appelées protéines.

Un polypeptide peut être composé d'acides aminés autres que les 20 acides aminés codés par les gènes humains. Un polypeptide peut également être composé d'acides aminés modifiés par des processus naturels, tels que le processus de maturation post-traductionnel ou par des procédés chimiques, qui sont bien connus de l'homme du métier. Le même type de modification peut être présent à plusieurs endroits du polypeptide et n'importe où dans le polypeptide : dans le squelette peptidique, dans la chaîne d'acides aminés ou encore aux extrémités carboxy- ou amino-terminales.

Un polypeptide peut être ramifié suite à une ubiquitination ou être cyclique avec ou sans ramification. Ce type de modifications peut être le résultat de processus de post-traduction naturel ou synthétique, qui sont bien connus de l'homme du métier.

On entend, par exemple, par modifications d'un polypeptide, l'acétylation, l'acylation, l'ADP-ribosylation, l'amidation, la fixation covalente de flavine, la fixation covalente d'un hème, la fixation covalente d'un nucléotide ou d'un dérivé nucléotidique, la fixation covalente d'un lipide ou d'un dérivé lipidique, la fixation covalente d'un phosphatidylinositol, la réticulation covalente ou non-covalente, la cyclisation, la formation de pont disulfure, la déméthylation, la formation de cystéine, la formation de pyroglutamate, la formylation, la gamma-carboxylation, la glycosylation, la formation d'ancre au GPI, l'hydroxylation, l'iodisation, la

méthylation, la myristoylation, l'oxydation, le processus protéolytique, la phosphorylation, la prénylation, la racémisation, la sénéloylation, la sulfatation, l'addition d'acides aminés, telle que l'arginylation ou l'ubiquitination. (PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993) and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications : Perspectives and Prospects, pgs 1-12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983) ; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 : 626-646 (1990) and Rattan et al., Protein Synthesis : Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663 : 48-62 (1992)).

On entend par "isolé", modifié par la main de l'homme à partir de l'état naturel, c'est-à-dire que le polynucléotide ou le polypeptide présent dans la nature a été modifié ou isolé de son environnement naturel, ou les deux. Par exemple, un polynucléotide ou un polypeptide naturellement présent dans un organisme vivant n'est pas "isolé", mais le même polynucléotide ou polypeptide séparé des matériaux coexistants dans son état naturel est "isolé".

On entend par "pourcentage d'identité" entre deux séquences polynucléotidiques ou polypeptidiques le pourcentage de nucléotides ou d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons entre deux séquences polynucléotidiques ou polypeptidiques sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par "fenêtre de comparaison" pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. Cette comparaison peut être réalisée grâce à un programme, par

exemple le programme EMBOSS-Needle (alignement global Needleman-Wunsch) à l'aide de la matrice BLOSUM62/Open Gap 10.0 et Extension Penalty de 0,5 (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970), *J. Mol. Biol.* 48, 443-453 et Kruskal, J.B. (1983), An overview of sequence comparison, In D. Sankoff and J.B. Kruskal, (ed), *Time warps, strind edits and macromolecules : the theory and practice of sequence comparison*, pp. 1-44 Addison Wesley).

Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou l'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100.

Un polypeptide ayant, par exemple, une identité d'au moins 95% avec le polypeptide ID SEQ N°2 est un polypeptide comportant, au plus, 5 acides aminés modifiés sur 100 acides aminés, par rapport à ladite séquence. En d'autres termes jusqu'à 5% des acides aminés dans la séquence ID SEQ N°2 peuvent être délétés ou substitués par un autre acide aminé ou la séquence peut comporter jusqu'à 5% d'acides aminés en plus par rapport au nombre total d'acides aminés de la séquence ID SEQ N°2. Ces altérations de la séquence peuvent être situées aux positions amino et/ou carboxy-terminales de la séquence d'acides aminés ou à un endroit quelconque entre ces positions terminales, en un ou plusieurs emplacements. (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987).

Par analogie, un polynucléotide ayant une identité d'au moins 95% avec un second polynucléotide est donc un polynucléotide comportant, au plus, 5 nucléotides modifiés

sur 100 nucléotides, par rapport à la séquence dudit second polynucléotide. En d'autres termes jusqu'à 5% des nucléotides dudit second polynucléotide peuvent être délétés ou substitués par un autre nucléotide, ou ledit polynucléotide peut comporter jusqu'à 5% de nucléotides en plus par rapport au nombre total de nucléotides du second polynucléotide. Ces modifications peuvent être positionnées aux extrémités 3' et/ou 5', ou à un endroit quelconque entre ces extrémités, en un seul ou plusieurs emplacements.

10 On entend par "cellule hôte", une cellule qui a été transformée ou transfectée, ou est capable de transformation ou de transfection, par une séquence polynucléotidique exogène.

On entend par "milieu de culture", le milieu dans lequel on purifie le polypeptide de l'invention. Ce milieu peut être constitué par le milieu extracellulaire et/ou le lysat cellulaire. Des techniques bien connues de l'homme du métier permettent également à ce dernier de redonner la conformation active au polypeptide, si la conformation dudit polypeptide a été altérée lors de l'isolation ou de la purification.

On entend par "fonction", l'activité biologique d'un polypeptide ou d'un polynucléotide.

La fonction d'un polypeptide conforme à l'invention est celle d'un antigène de Legionella pneumophila et celle du polynucléotide conforme à l'invention est de coder ce polypeptide.

On entend par "antigène", tout composé qui, seul ou en association avec un adjuvant ou porteur, est capable d'induire une réponse immunitaire spécifique. Cette définition comprend également tout composé présentant une analogie structurale avec ledit antigène capable d'induire une réponse immunologique dirigée contre ledit antigène.

On entend par "analogie structurale" une analogie aussi bien de la structure primaire (séquence) que de la structure secondaire (éléments structuraux), de la structure tertiaire (structure tridimensionnelle) ou de la

structure quaternaire (association de plusieurs polypeptides dans un même complexe) (BIOCHEMISTRY, 4ème Ed, L. Stryer, New York, 1995).

On entend par "variant" d'un polynucléotide dit initial ou d'un polypeptide dit initial, respectivement, un polynucléotide ou un polypeptide qui en diffère par au moins un nucléotide ou un acide aminé, mais qui garde les mêmes propriétés intrinsèques, c'est-à-dire la même fonction.

Une différence dans la séquence polynucléotidique du variant peut altérer ou non la séquence d'acides aminés du polypeptide qu'il code, par rapport à un polypeptide initial. Néanmoins, par définition, ces variants doivent conférer la même fonction que la séquence polynucléotidique initiale, par exemple, coder un polypeptide ayant une fonction antigénique.

Le polynucléotide ou le polypeptide variant diffère généralement du polynucléotide initial ou du polypeptide initial par une (ou plusieurs) substitution(s), addition(s), délétion(s), fusion(s) ou troncation(s) ou plusieurs de ces modifications, prises en combinaison. Un variant non-naturel d'un polynucléotide initial ou d'un polypeptide initial peut être obtenu, par exemple, par mutagenèse dirigée ou par synthèse directe.

On définit comme "séquence polynucléotidique complémentaire à la séquence polynucléotidique", un polynucléotide qui peut être hybridé avec cette séquence polynucléotidique dans des conditions stringentes.

On entend généralement, mais pas nécessairement, par "conditions stringentes" les conditions chimiques qui permettent une hybridation lorsque les séquences polynucléotidiques ont une identité d'au moins 80%.

Ces conditions peuvent être obtenues selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

On entend par "anticorps", les anticorps monoclonaux, polyclonaux, chimériques, simple chaîne, humanisés, ainsi

que les fragments Fab, incluant les produits d'un Fab ou d'une banque d'expression d'immunoglobulines.

Un anticorps immunospécifique peut être obtenu par administration à un animal d'un polypeptide donné, suivie
5 d'une récupération des anticorps produits par ledit animal par extraction depuis ses fluides corporels. On peut également administrer à l'animal un variant dudit polypeptide, ou des cellules hôtes exprimant ce polypeptide.

10 Le terme "immunospécifique" appliqué au terme anticorps, vis-à-vis d'un polypeptide donné, signifie que l'anticorps possède une meilleure affinité pour ce polypeptide que pour d'autres polypeptides connus de l'art antérieur.

15 Comme indiqué plus haut, l'invention a pour objet de nouveaux polynucléotides, polypeptides, vecteurs d'expression comprenant ledit polynucléotide et cellules hôtes comprenant ledit vecteur d'expression, leur production, et leur utilisation dans la production
20 d'anticorps, le domaine du diagnostic in vitro et/ou la production de vaccins contre *Legionella pneumophila*.

Les polynucléotides

La présente invention a notamment pour objet un polynucléotide isolé comprenant la séquence
25 polynucléotidique ID SEQ N°1 (appelée 2A1 et extraite à partir du génome de *Legionella pneumophila*). L'invention vise également un polynucléotide isolé comprenant :

- a) une partie de la séquence ID SEQ N°1 ayant la même fonction que la séquence ID SEQ N°1, ou
- 30 b) une séquence polynucléotidique ayant au moins 60% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité, et mieux au moins 90% d'identité, avec la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1, ou avec la partie de séquence telle que définie sous a), et ayant la même fonction que la séquence
35 ID SEQ N°1, ou

c) une séquence polynucléotidique complémentaire à la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1 ou à la partie de séquence définie sous a) ou à la séquence définie sous b).

La présente invention concerne aussi un
5 polynucléotide isolé, comprenant la séquence ID SEQ N°1, codant pour le polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2.

Les polynucléotides de l'invention peuvent être obtenus par les méthodes standard de synthèse d'ADN ou
10 d'ARN.

Les polynucléotides conformes à l'invention peuvent également comprendre des séquences polynucléotidiques comme les séquences 5' et/ou 3' non-codantes, telles que, par exemple, des séquences transcrites, des séquences non-
15 traduites, des séquences signal d'épissage, des séquences polyadénylées, des séquences de liaison avec des ribosomes ou encore des séquences qui stabilisent l'ARNm.

Les vecteurs d'expression et les cellules hôtes

La présente invention a aussi pour objet un vecteur
20 recombinant comprenant au moins un polynucléotide conforme à l'invention.

De nombreux systèmes d'expression peuvent être utilisés comme, par exemple, les chromosomes, les épisomes, les virus dérivés. Plus particulièrement, les vecteurs
25 recombinants utilisés peuvent être dérivés de plasmides bactériens, de transposons, d'épisome de levure, d'éléments d'insertion, d'éléments chromosomiques de levures, de virus tels que les baculovirus, les papillonna virus comme SV40, les vaccinia virus, les adénovirus, les fox pox virus, les
30 pseudorabies virus, les rétrovirus.

Ces vecteurs recombinants peuvent également être des dérivés de cosmides ou de phagemides. La séquence polynucléotidique peut être insérée dans le vecteur recombinant d'expression par les méthodes bien connues de
35 l'homme du métier.

Le vecteur recombinant peut comprendre des séquences polynucléotidiques de contrôle de la régulation de

l'expression du polynucléotide ainsi que des séquences polynucléotidiques permettant l'expression et la transcription d'un polynucléotide de l'invention et la traduction d'un polypeptide de l'invention, ces séquences étant choisies en fonction des cellules hôtes mises en oeuvre.

La présente invention a aussi pour objet une cellule hôte comprenant un vecteur recombinant conforme à l'invention.

L'introduction du vecteur recombinant dans une cellule hôte peut être effectuée selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la transfection par phosphate de calcium, la transfection par lipides cationiques, l'électroporation, la transduction ou l'infection.

Les cellules hôtes peuvent être, par exemple, des cellules bactériennes telles que des cellules de streptocoques, de staphylocoques, d'*Escherichia coli* ou de *Bacillus subtilis*, des cellules de champignons telles que des cellules de levure et des cellules d'*Aspergillus*, des cellules de *Streptomyces*, des cellules d'insectes telles que des cellules de *Drosophila S2* et de *Spodoptera Sf9*, des cellules animales, telles que les cellules CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 ou encore des cellules végétales.

25 Les polypeptides

La présente invention a aussi pour objet un polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 (appelée protéine 2A1), codée par la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1. La présente invention vise également un polypeptide isolé comprenant :

a) une partie de la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 ayant la même fonction que la séquence ID SEQ N°2, ou

b) une séquence d'acides aminés ayant au moins 60% d'identité, de préférence au moins 80% d'identité, et mieux au moins 90% d'identité, avec la séquence d'acides aminés

ID SEQ N°2, ou avec la partie de séquence définie sous a), et ayant la même fonction que la séquence ID SEQ N°2.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un polypeptide tel que défini ci-dessus, dans lequel une cellule hôte définie précédemment est cultivée et ledit polypeptide est isolé du milieu de culture.

Le polypeptide peut être purifié à partir des cellules hôtes, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier telles que la précipitation à l'aide d'agents chaotropiques comme les sels, en particulier le sulfate d'ammonium, l'éthanol, l'acétone ou l'acide trichloroacétique, ou de moyens tels que l'extraction à l'acide, la chromatographie échangeuse d'ions, la chromatographie sur phosphocellulose, la chromatographie par interaction hydrophobe, la chromatographie d'affinité, la chromatographie sur hydroxylapatite ou les chromatographies d'exclusion.

Les anticorps

La présente invention a aussi pour objet un procédé d'obtention d'anticorps immunospécifiques, ainsi que les anticorps immunospécifiques pour les polypeptides conformes à l'invention, tels que définis précédemment.

Les anticorps immunospécifiques peuvent être obtenus par administration d'un polypeptide selon l'invention, d'un de ses fragments, d'un analogue ou d'un fragment épitopique ou d'une cellule exprimant ce polypeptide, à un mammifère, de préférence non humain, selon les méthodes bien connues de l'homme du métier.

Pour la préparation d'anticorps monoclonaux, on peut utiliser des méthodes usuelles de production d'anticorps, à partir de lignées cellulaires, telles que la technique des hybridomes, la technique des triomes, la technique des hybridomes de cellules B humaines et la technique des hybridomes EBV.

Sérologie

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide selon l'invention pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques la présence d'anticorps dirigés contre *Legionella pneumophila*.

5 L'invention vise également l'utilisation d'anticorps, selon l'invention, pour détecter, *in vitro*, dans des échantillons biologiques la présence d'antigènes de *Legionella pneumophila*.

10 L'invention vise, en outre, l'utilisation de polypeptides et d'anticorps selon l'invention, pour détecter, périodiquement, *in vitro*, respectivement, les anticorps dirigés contre *Legionella pneumophila* et les antigènes de *Legionella pneumophila* et ainsi suivre l'évolution de la pathologie et de l'effet d'un traitement
15 appliqué à un patient.

Les échantillons biologiques testés peuvent être du sang, de l'urine, de la salive, du liquide de ponction de sérologie (par exemple liquide céphalo-rachidien, liquide pleural ou liquide articulaire) ou l'un de leurs
20 constituants (par exemple, le sérum).

Les kits

L'invention a également pour objet des kits de diagnostic *in vitro* comprenant au moins l'un des polypeptides conformes à l'invention ainsi que des kits de
25 diagnostic *in vitro* comprenant au moins l'un des anticorps conformes à l'invention.

Les vaccins

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, utilisable comme vaccin,
30 renfermant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon l'invention ou un polynucléotide ou un vecteur recombinant ou une cellule hôte selon l'invention.

Partie expérimentale

A) Protocole d'obtention des antigènes

35 Clonage de la séquence codant la protéine 2A1

Le gène codant pour les séquences de la protéine 2A1, qui est un antigène, est obtenu par amplification par PCR à

partir de l'ADN génomique de la bactérie *Legionella pneumophila* (souche Philadelphia-1, ATCC 33152) en utilisant comme couple d'amorces :

- l'oligonucléotide sens contenant la séquence :
5'-ACGTTTGTTTTAAAGGAATTTG-3' ; et
- l'oligonucléotide antisens contenant la séquence :
5'-TACGGTCGGTTTGCTGGTC-3'

Le fragment ainsi amplifié correspondant est cloné dans un vecteur selon des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. Ce vecteur permet la production de la protéine clonée sous contrôle d'un promoteur inductible par l'isopropyl-thiogalactoside (IPTG). La protéine clonée correspond à la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2.

15 Expression de la protéine 2A1

Une souche d'*Escherichia coli* est transformée par le vecteur d'expression précédemment décrit. Les bactéries sélectionnées sont mises à cultiver une nuit à 30°C sous agitation dans 30 ml de milieu Luria Bertani (LB, J. Miller, "A short Course in Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992) contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml. Le lendemain, la culture est diluée au 1/50ème dans un volume final de 1 litre de milieu LB additionné d'ampicilline à une concentration finale de 100 µg/ml et incubée à 30°C sous agitation. Lorsque la turbidité de la culture atteint une valeur d'absorbance à 600 nm (A600) d'environ 0,7, la production de la protéine est induite par l'IPTG à une concentration finale de 0,1 mM. Les bactéries sont récoltées par centrifugation (10 minutes à 1400xg et à 4°C) lorsque la turbidité de la culture atteint une A600 d'environ 1,5.

Purification

Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 20 mM à pH 8,0 contenant du saccharose à 0,5 mM, puis traitées par du lysozyme (0,2 g/l) en présence d'acide éthylènediaminotétraacétique

(EDTA) 12,5 mM, de DNase, RNase et PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle). La suspension est incubée 30 minutes à 4°C puis centrifugée 10 minutes à 4°C à 15500xg. Le culot est congelé à -20°C pendant au moins une nuit.

Après décongélation, les bactéries sont reprises dans un tampon Mes 25 mM à pH 6,0, puis soniquées 4 fois 20 secondes dans la glace. Après centrifugation à 15500xg à 4°C pendant 30 minutes, le surnageant est filtré sur membrane de porosité 0,22 µm. Le filtrat est alors déposé sur une colonne échangeuse de cation (par exemple, SP-Sépharose 12 ml, Amersham Biosciences). Après lavage de la colonne, la protéine est éluée par un gradient linéaire de 0 à 1 M de NaCl dans du tampon Mes [acide 2-(N-morpholino) éthane sulfonique] 25 mM à pH 6,0 en 20 volumes de colonne. Les fractions contenant la protéine sont rassemblées et les protéines sont précipitées par du sulfate d'ammonium à une concentration finale de 0,6 g/l. La solution est laissée au moins une nuit à 4°C puis centrifugée 30 minutes à 20800xg. Le culot est alors repris dans un volume le plus faible possible (en général 300 µl de tampon Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0 contenant du NaCl 100 mM puis déposé sur une colonne de gel filtration, par exemple SuperdexHR75-10/30, Amersham). Les fractions éluées contenant la protéine sont rassemblées et du glycérol est ajouté à une concentration finale de 20%. Les protéines purifiées sont alors stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation dans les tests.

Les concentrations des protéines sont déterminées spectrophotométriquement à partir des coefficients d'absorption calculés par la méthode de Pace (Pace CN, Vajdos F., Fee L., Grimsley G. Et Gray T., (1995), Protein Science 4, 2411-2423). La pureté des protéines est vérifiée par analyse par électrophorèse SDS-PAGE et par spectrométrie de masse.

35 B) Test de diagnostic *in vitro*

Il a été utilisé des sérums provenant de patients ayant eu une infection documentée à *Legionella pneumophila*

(collection du laboratoire). L'infection a pu être avérée soit par l'isolement/culture des bactéries à partir de prélèvements broncho-pulmonaires, soit par la mise en évidence d'une séroconversion ou encore par un test urinaire positif.

Les sérums témoins correspondaient à des sérums de donneurs de sang (collection du laboratoire).

La fixation, sur la protéine 2A1 recombinante purifiée (obtenue comme décrit précédemment), des anticorps présents dans les sérums peut être évaluée soit par des tests en Western Blot soit par la technique ELISA.

Protocole du test en Western blot

Après transfert, sur une membrane de nitrocellulose, de la protéine purifiée 2A1, la membrane est saturée 30 minutes à l'aide d'une solution de "tampon salin phosphate" (PBS) contenant 3% de lait demi-écrémé. Après trois lavages par du PBS contenant du polyoxyéthylène sorbitan (Tween) à 0,05%, la membrane est mise en présence du sérum testé à la dilution adéquate (soit 1/300ème) dans du tampon PBS contenant 3% de lait demi-écrémé pendant 45 minutes. Après trois nouveaux lavages, des anticorps anti-immunoglobulines G, A, M humaines de chèvre (par exemple 170-6462, Biorad), marqués à la phosphatase alcaline, sont ajoutés simultanément, pendant une période de 30 minutes après avoir été dilués selon le protocole du fournisseur dans du tampon PBS contenant 3% de lait demi-écrémé. Trois nouveaux lavages sont réalisés puis du phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyde et du nitroblue tetrazolium sont ajoutés selon les indications du fournisseur jusqu'à l'obtention du résultat. Un résultat "positif" correspond à une précipitation du substrat sur la membrane à la position de 2A1.

Protocole du test en ELISA

Les plaques ELISA sont laissées pendant une nuit à 4°C en présence de 0,5 µg d'antigène purifié (protéine recombinante 2A1) dans du "tampon salin phosphate" (PBS). Après quatre lavages par du PBS contenant du

polyoxyéthylène sorbitan (Tween) à 0,05%, les plaques sont saturées une heure à 37°C par du PBS-Tween contenant 5% de lait demi-écrémé (250 µl par puits). Quatre nouveaux lavages sont réalisés, puis 100 µl de chaque sérum positif, à la dilution adéquate (soit 1/300ème) dans du tampon PBS-Tween contenant 5% de lait demi-écrémé, sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite laissée à 25°C pendant 30 minutes. Après quatre nouveaux lavages, des anticorps anti-immunoglobulines G, A, M humaines de chèvre marqués à la phosphatase alcaline sont ajoutés simultanément pendant 30 minutes à 25°C après avoir été dilués selon le protocole du fournisseur dans du tampon PBS-Tween contenant 5% de lait demi-écrémé. Quatre nouveaux lavages sont réalisés puis 100 µl de substrat (phosphate de p-nitrophényle), pNPP, par exemple A-3469, Sigma) sont ajoutés. L'absorbance à 405 nm de chacun des puits est mesurée après une incubation de 30 minutes à 37°C.

Résultats et interprétation

Un résultat type obtenu est présenté dans le tableau ci-après, sachant que les sérums dits "positifs" dans ce tableau sont ceux contenant des anticorps contre *Legionella pneumophila* identifiés par leur liaison avec les polypeptides (antigènes) de l'invention par Western blot :

Tableau de résultats du test en Western blot

Nombre de sérums de malades infectés par <i>Legionella pneumophila</i> , diagnostiqués selon l'art antérieur et soumis au diagnostic selon l'invention	24
Sérums "positifs" parmi les 24 testés	18, soit 75%
Sérums de donneurs de sang comme témoins	111
Sérums "positifs" parmi les 111 testés	4, soit 3,6%

5

Des résultats similaires sont obtenus en ELISA.

D'après le Tableau, on constate que, par le test Western blot ou par le test ELISA, on identifie *in vitro* au moins 70 % des infections à *Legionella pneumophila*, grâce à l'antigène selon l'invention. Il est donc démontré, d'une part, l'existence chez l'homme d'une réponse anticorps significative (la probabilité associée à un test de χ^2 est inférieure à 0,05) vis-à-vis de la protéine 2A1 au cours des infections à *Legionella pneumophila* et, d'autre part, que la protéine 2A1 est pertinente pour le diagnostic sérologique de ce type d'infection.

De plus l'utilisation de l'antigène 2A1 selon l'invention permet, dans certains cas, l'identification de malades non détectés à ce stade de l'infection (mais confirmés dans des analyses ultérieures) par les techniques de sérologie de l'art antérieur.

20

REVENDICATIONS

1. Polynucléotide isolé comprenant :
 - a) la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1, ou
 - 5 b) une partie de la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1 ayant la même fonction que la séquence ID SEQ N°1, ou
 - c) une séquence polynucléotidique ayant au moins 60% d'identité avec la séquence polynucléotidique ID SEQ N°1 ou
 - 10 avec la partie de séquence telle que définie sous b), et ayant la même fonction que la séquence ID SEQ N°1, ou
 - d) une séquence polynucléotidique complémentaire à une séquence polynucléotidique telle que définie sous a), b) ou c).
- 15 2. Polynucléotide isolé selon le point a) de la revendication 1, caractérisé en ce qu'il code pour le polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2.
3. Vecteur recombinant comprenant un polynucléotide
- 20 selon la revendication 1 ou 2.
4. Cellule hôte comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 3.
5. Procédé de préparation d'un polypeptide, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver une cellule
- 25 hôte selon la revendication 4 et à isoler ledit polypeptide du milieu de culture.
6. Polypeptide isolé comprenant :
 - a) la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2, ou
 - b) une partie de la séquence d'acides aminés
 - 30 ID SEQ N°2 ayant la même fonction que la séquence ID SEQ N°2, ou
 - c) une séquence d'acides aminés ayant au moins 60% d'identité avec la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2 ou
 - avec la partie de séquence telle que définie sous b), et
 - 35 ayant la même fonction que la séquence d'acides aminés ID SEQ N°2.

7. Anticorps immunospécifique pour un polypeptide selon la revendication 6.

8. Utilisation des polypeptides selon la revendication 6 pour détecter, *in vitro*, la présence
5 d'anticorps à *Legionella pneumophila* dans des échantillons biologiques.

9. Utilisation des anticorps selon la revendication 7 pour détecter, *in vitro*, la présence d'antigènes *Legionella pneumophila* dans des échantillons biologiques.

10 10. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, comprenant à titre de principe actif au moins un polypeptide selon la revendication 6, ainsi qu'un excipient pharmaceutiquement acceptable.

11. Composition pharmaceutique, notamment vaccin,
15 comprenant au moins un polynucléotide selon l'une des revendications 1 ou 2, ou un vecteur recombinant selon la revendication 3 ou une cellule hôte selon la revendication 4.

12. Kit pour l'utilisation selon la revendication 8,
20 caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un desdits polypeptides.

13. Kit pour l'utilisation selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un desdits anticorps.

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> ABAG et Université Claude Bernard Lyon 1

<120> Nouvelles protéines permettant, notamment, la mise en évidence in vitro et la prévention des infections à Legionella pneumophila

<130> B3895

<150> FR 04 08714

<151> 2004-08-06

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1332

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1332)

<223>

<400> 1	
acg ttt gtt tta aag gaa ttt gat gca cta aaa agt cat ttt aac gac	48
Thr Phe Val Leu Lys Glu Phe Asp Ala Leu Lys Ser His Phe Asn Asp	
1 5 10 15	
acc gtt aaa atc atc ctt caa cgc gaa aaa aag gac aaa att gaa gac	96
Thr Val Lys Ile Ile Leu Gln Arg Glu Lys Lys Asp Lys Ile Glu Asp	
20 25 30	
ctt ccc aac ccc aga aaa gaa gag ctt caa ttt ctg acc gct gtt ctc	144
Leu Pro Asn Pro Arg Lys Glu Glu Leu Gln Phe Leu Thr Ala Val Leu	
35 40 45	
aat caa ttg gaa gca aaa atc gat gaa ctg aaa cca cgt tct ttg gcc	192
Asn Gln Leu Glu Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Pro Arg Ser Leu Ala	
50 55 60	

agc	tat	gtc	cat	gta	ttt	tat	ggt	gct	atg	ctg	ctt	gtc	tgt	aaa	gac	240
Ser	Tyr	Val	His	Val	Phe	Tyr	Gly	Ala	Met	Leu	Leu	Val	Cys	Lys	Asp	
65					70					75					80	
gtt	gaa	aat	aat	ctg	cgg	gtg	atg	gaa	aag	aaa	gaa	aac	agc	ttg	ctg	288
Val	Glu	Asn	Asn	Leu	Arg	Val	Met	Glu	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Leu	Leu	
				85					90					95		
ttt	act	cgc	tta	atg	gat	ggt	atg	ggt	att	tct	gat	gaa	aat	ata	cca	336
Phe	Thr	Arg	Leu	Met	Asp	Gly	Met	Gly	Ile	Ser	Asp	Glu	Asn	Ile	Pro	
			100					105						110		
aca	tct	gag	cag	aac	atc	atg	ttt	tac	aga	gga	tta	aac	aaa	ttc	tta	384
Thr	Ser	Glu	Gln	Asn	Ile	Met	Phe	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asn	Lys	Phe	Leu	
		115					120					125				
aat	ttc	att	tat	gaa	agc	aat	gat	tct	cgt	aaa	ggc	tta	aaa	aag	gag	432
Asn	Phe	Ile	Tyr	Glu	Ser	Asn	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Leu	Lys	Lys	Glu	
	130					135					140					
cat	ttc	ctg	caa	gtc	ctt	tcg	tta	aaa	aag	ata	tac	tct	tta	gcc	aaa	480
His	Phe	Leu	Gln	Val	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys	Ile	Tyr	Ser	Leu	Ala	Lys	
145					150					155					160	
tta	agt	tat	gag	cag	gaa	gag	gca	gct	gaa	aat	aat	gct	ttg	gca	aaa	528
Leu	Ser	Tyr	Glu	Gln	Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	Asn	Asn	Ala	Leu	Ala	Lys	
				165					170					175		
tta	act	gct	gat	gga	aaa	acc	aaa	gcc	aat	gcg	aac	agc	ttc	cat	gtg	576
Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ala	Asn	Ala	Asn	Ser	Phe	His	Val	
			180					185						190		
gaa	aaa	cca	atc	gat	tca	tcc	att	gtt	gag	caa	ttc	aaa	tcc	tg	gat	624
Glu	Lys	Pro	Ile	Asp	Ser	Ser	Ile	Val	Glu	Gln	Phe	Lys	Ser	Trp	Asp	
		195					200					205				
gaa	atg	aaa	ggc	gct	ctt	cat	caa	tta	att	ctc	gat	gaa	ctt	tct	gat	672
Glu	Met	Lys	Gly	Ala	Leu	His	Gln	Leu	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Ser	Asp	
	210					215					220					
aag	aac	gtt	gct	aaa	att	tca	gct	tta	agt	caa	gcc	cgc	tcc	gca	caa	720
Lys	Asn	Val	Ala	Lys	Ile	Ser	Ala	Leu	Ser	Gln	Ala	Arg	Ser	Ala	Gln	
225					230					235					240	
ctg	aaa	ttt	tta	caa	acg	atg	gca	gaa	caa	cta	gac	aag	atc	cct	aac	768
Leu	Lys	Phe	Leu	Gln	Thr	Met	Ala	Glu	Gln	Leu	Asp	Lys	Ile	Pro	Asn	
				245						250				255		
caa	tct	ctt	gag	cgc	tct	gag	aaa	atg	gcc	att	ctt	gct	gga	gca	atg	816
Gln	Ser	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Lys	Met	Ala	Ile	Leu	Ala	Gly	Ala	Met	
			260					265					270			
tat	atc	gtt	cgt	ggc	caa	ata	gcc	cag	gag	tat	gga	aaa	gat	cca	tta	864
Tyr	Ile	Val	Arg	Gly	Gln	Ile	Ala	Gln	Glu	Tyr	Gly	Lys	Asp	Pro	Leu	
		275					280					285				
agc	aac	gat	aaa	atc	agc	gct	act	gtg	att	cat	aca	ggt	tta	agc	acg	912
Ser	Asn	Asp	Lys	Ile	Ser	Ala	Thr	Val	Ile	His	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr	
	290					295					300					

ata ctt cat gcc aat gct gat tgc tgt gaa gac aag gaa gta ctg att 960
 Ile Leu His Ala Asn Ala Asp Cys Cys Glu Asp Lys Glu Val Leu Ile
 305 310 315 320

gct gct gcg aat aaa ttt att cgt cat atg gtt att gag cgt cct gaa 1008
 Ala Ala Ala Asn Lys Phe Ile Arg His Met Val Ile Glu Arg Pro Glu
 325 330 335

caa tca aat aaa aaa atc act aag gaa tcc gtt cga gaa aac aac atg 1056
 Gln Ser Asn Lys Lys Ile Thr Lys Glu Ser Val Arg Glu Asn Asn Met
 340 345 350

ttt tcc gac atc gcc ggc ttc caa ttg atc tct gtc ttg acg tta ata 1104
 Phe Ser Asp Ile Ala Gly Phe Gln Leu Ile Ser Val Leu Thr Leu Ile
 355 360 365

caa aac atg atc aaa aca tgt cgt act gat gcc att gaa gct tgt gtc 1152
 Gln Asn Met Ile Lys Thr Cys Arg Thr Asp Ala Ile Glu Ala Cys Val
 370 375 380

acc aag cgt aag gaa gaa ctc gaa gca tta aaa ccc aaa aaa gag ggt 1200
 Thr Lys Arg Lys Glu Glu Leu Glu Ala Leu Lys Pro Lys Lys Glu Gly
 385 390 395 400

tat tcc att gcg agt tca gtc act gga tat gta ggc agc tgg ttt aaa 1248
 Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Val Thr Gly Tyr Val Gly Ser Trp Phe Lys
 405 410 415

aaa gca cca agc atg tct gaa gaa gac gaa gaa gat gac tta aaa gat 1296
 Lys Ala Pro Ser Met Ser Glu Glu Asp Glu Glu Asp Asp Leu Lys Asp
 420 425 430

caa aac aca gca gaa gag acc agc aaa ccg acc gta 1332
 Gln Asn Thr Ala Glu Glu Thr Ser Lys Pro Thr Val
 435 440

<210> 2

<211> 444

<212> PRT

<213> Legionella pneumophila

<400> 2

Thr Phe Val Leu Lys Glu Phe Asp Ala Leu Lys Ser His Phe Asn Asp
 1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ile Leu Gln Arg Glu Lys Lys Asp Lys Ile Glu Asp
 20 25 30

Leu Pro Asn Pro Arg Lys Glu Glu Leu Gln Phe Leu Thr Ala Val Leu
 35 40 45

Asn Gln Leu Glu Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Pro Arg Ser Leu Ala
 50 55 60

Ser Tyr Val His Val Phe Tyr Gly Ala Met Leu Leu Val Cys Lys Asp
 65 70 75 80

Val Glu Asn Asn Leu Arg Val Met Glu Lys Lys Glu Asn Ser Leu Leu
 85 90 95

Phe Thr Arg Leu Met Asp Gly Met Gly Ile Ser Asp Glu Asn Ile Pro
 100 105 110

Thr Ser Glu Gln Asn Ile Met Phe Tyr Arg Gly Leu Asn Lys Phe Leu
 115 120 125

Asn Phe Ile Tyr Glu Ser Asn Asp Ser Arg Lys Gly Leu Lys Lys Glu
 130 135 140

His Phe Leu Gln Val Leu Ser Leu Lys Lys Ile Tyr Ser Leu Ala Lys
 145 150 155 160

Leu Ser Tyr Glu Gln Glu Glu Ala Ala Glu Asn Asn Ala Leu Ala Lys
 165 170 175

Leu Thr Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ala Asn Ala Asn Ser Phe His Val
 180 185 190

Glu Lys Pro Ile Asp Ser Ser Ile Val Glu Gln Phe Lys Ser Trp Asp
 195 200 205

Glu Met Lys Gly Ala Leu His Gln Leu Ile Leu Asp Glu Leu Ser Asp
 210 215 220

Lys Asn Val Ala Lys Ile Ser Ala Leu Ser Gln Ala Arg Ser Ala Gln
 225 230 235 240

Leu Lys Phe Leu Gln Thr Met Ala Glu Gln Leu Asp Lys Ile Pro Asn
 245 250 255

Gln Ser Leu Glu Pro Ser Glu Lys Met Ala Ile Leu Ala Gly Ala Met
 260 265 270

Tyr Ile Val Arg Gly Gln Ile Ala Gln Glu Tyr Gly Lys Asp Pro Leu
 275 280 285

Ser Asn Asp Lys Ile Ser Ala Thr Val Ile His Thr Gly Leu Ser Thr
 290 295 300

Ile Leu His Ala Asn Ala Asp Cys Cys Glu Asp Lys Glu Val Leu Ile
 305 310 315 320

Ala Ala Ala Asn Lys Phe Ile Arg His Met Val Ile Glu Arg Pro Glu
 325 330 335

Gln Ser Asn Lys Lys Ile Thr Lys Glu Ser Val Arg Glu Asn Asn Met
 340 345 350

Phe Ser Asp Ile Ala Gly Phe Gln Leu Ile Ser Val Leu Thr Leu Ile
 355 360 365

Gln Asn Met Ile Lys Thr Cys Arg Thr Asp Ala Ile Glu Ala Cys Val
 370 375 380

Thr Lys Arg Lys Glu Glu Leu Glu Ala Leu Lys Pro Lys Lys Glu Gly
 385 390 395 400

Tyr Ser Ile Ala Ser Ser Val Thr Gly Tyr Val Gly Ser Trp Phe Lys
 405 410 415

Lys Ala Pro Ser Met Ser Glu Glu Asp Glu Glu Asp Asp Leu Lys Asp
 420 425 430

Gln Asn Thr Ala Glu Glu Thr Ser Lys Pro Thr Val
 435 440

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/001549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K14/195

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HELBIG JÜRGEN H ET AL: "Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. FEB 2003, vol. 41, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 838-840, XP002313797 ISSN: 0095-1137 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-13

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2005

Date of mailing of the international search report

06/12/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou-Bourges, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2005/001549

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>CHIEN MINCHEN ET AL: "The genomic sequence of the accidental pathogen Legionella pneumophila." SCIENCE. 24 SEP 2004, vol. 305, no. 5692, 24 September 2004 (2004-09-24), pages 1966-1968, XP002313850 ISSN: 1095-9203 sequences Q5ZXU7,AE017354 -----</p>	
T	<p>CAZALET CHRISTEL ET AL: "Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity." NATURE GENETICS. NOV 2004, vol. 36, no. 11, November 2004 (2004-11), pages 1165-1173, XP002313851 ISSN: 1061-4036 sequences Q5X7B7,CR628336 -----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De Internationale No
PCT/FR2005/001549

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE C07K14/195		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C07K C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HELBIG JÜRGEN H ET AL: "Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. FEB 2003, vol. 41, no. 2, février 2003 (2003-02), pages 838-840, XP002313797 ISSN: 0095-1137 le document en entier ----- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 22 novembre 2005		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 06/12/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Loubradou-Bourges, N

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
T	<p>CHIEN MINCHEN ET AL: "The genomic sequence of the accidental pathogen Legionella pneumophila." SCIENCE. 24 SEP 2004, vol. 305, no. 5692, 24 septembre 2004 (2004-09-24), pages 1966-1968, XP002313850 ISSN: 1095-9203 séquences Q5ZXU7,AE017354 -----</p>	
T	<p>CAZALET CHRISTEL ET AL: "Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity." NATURE GENETICS. NOV 2004, vol. 36, no. 11, novembre 2004 (2004-11), pages 1165-1173, XP002313851 ISSN: 1061-4036 séquences Q5X7B7,CR628336 -----</p>	