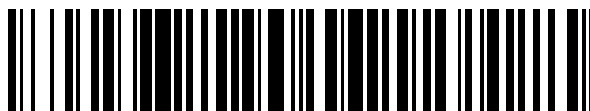


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 436**

51 Int. Cl.:
C07K 14/44 (2006.01)
A61K 39/008 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09766020 .3**
96 Fecha de presentación: **18.06.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2288619**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2011**

54 Título: **Péptido de síntesis no nativo ciclado y complejo de péptidos que comprende dicho péptido ciclado, destinado a inducir y a caracterizar la prevención o el tratamiento de afecciones en mamíferos**

30 Prioridad:
19.06.2008 FR 0803436

45 Fecha de publicación de la mención BOP:
24.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.07.2012

73 Titular/es:
PAPIEROK, Gérard
Résidence le Palais d'Orchidée 43bis rue du
Soldat Ferrari
83400 Hyères Les Palmiers, FR y
VICENS, Serge

72 Inventor/es:
VICENS, Serge y
HOTTIN, Gregory

74 Agente/Representante:
Sugrañes Moliné, Pedro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 385 436 T3

DESCRIPCIÓN

Péptido de síntesis no nativo ciclado y complejo de péptidos que comprende dicho péptido ciclado, destinado a inducir y a caracterizar la prevención o el tratamiento de afecciones en mamíferos

La presente invención se refiere a un péptido de síntesis no nativo ciclado mediante puente disulfuro y a su mezcla con otros dos péptidos de síntesis no nativos así como a un adyuvante, para formar un complejo destinado a inducir y a caracterizar la prevención o el tratamiento de afecciones en mamíferos cuya inmunidad protectora depende de la estimulación de los linfocitos de tipo Th1 y concretamente de un estado de hiperestimulación de tipo retardado.

Este complejo es notable más particularmente porque permite inducir una producción importante de anticuerpos específicos de isotipo IgG2, que permite en caso de afecciones asociadas a estado de hiperestimulación de tipo retardado, distinguir un animal o ser humano infectado o enfermo, de un animal o ser humano no infectado o no enfermo pero vacunado o tratado.

Finalmente la presente invención puede usarse como reactivo que induce una estimulación de los linfocitos de tipo Th1 concretamente para la prevención o el tratamiento de afecciones asociadas a estado de hiperestimulación inmediata y como reactivos de diagnóstico *in vitro* que permiten detectar los anticuerpos marcadores de vacunación o de tratamiento, es decir las IgG2 específicas del péptido ciclado. Finalmente, la presente invención también se refiere al papel neutralizante de esos IgG2 caracterizado por la inhibición de la proliferación de las formas promastigotas o amastigotas de *Leishmania*.

Numerosas situaciones patológicas están asociadas a un estado inmunitario de tipo Th1 o Th2.

Por ejemplo, la exacerbación de la vía Th2 correspondiente a un estado de hiperestimulación inmediata induce determinadas afecciones tales como dermatitis atópicas caninas, las alergias y el asma. La obtención de una curación para esas afecciones se realiza mediante inmunoestimulantes que permiten el paso de un estado de tipo Th2 a un estado inmunitario de tipo Th1.

Por otra parte, este estado inmunitario Th1 está en plena correlación con un estado de resistencia a los patógenos intracelulares, tales como *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Candida*, *Mycobacterium* y *Listeria*.

Con respecto a la inmunopatología del asma, la bibliografía a lo largo de la última década ha designado al linfocito T específico del alérgeno como principal responsable de la reacción inmunoalérgica (Magnan. A *et al.* "Cytokines, from atopy to asthma: the Th2 dogma revisited" Cell Mol Biol, 2001, 47, 679-687). Entre los linfocitos T, la subpoblación Th2 productora de IL4 aparece en primer lugar y es necesaria para la inducción de esta reacción. Por tanto es natural que se establezcan estrategias para seleccionar como diana específicamente los linfocitos y en particular los Th2.

Este tipo de estrategia también puede seguirse para las leishmaniosis.

Las leishmaniosis constituyen un conjunto complejo de infecciones parasitarias que causan estragos en grandes regiones del mundo (88 países, distribuidos en 4 de los 5 continentes, se ven afectados) y que son responsables de una gran gama de manifestaciones clínicas (cutáneas, mucocutáneas y viscerales, siendo estas la forma más grave ya que es mortal en ausencia de tratamiento).

350 millones de personas están expuestas al riesgo de contraerlas; aproximadamente 12 millones son portadores del parásito y se estima que la incidencia anual es de entre 2 y 2,5 millones de nuevos casos, de los cuales 500.000 personas están afectadas por leishmaniosis visceral.

La leishmaniosis visceral (LV) está provocada por parásitos del complejo *Leishmania donovani* (*L. infantum/chagasi* y *L. donovani*) que son parásitos intracelulares exclusivos del macrófago. Al contrario que otras especies de *Leishmania* que provocan formas cutáneas de la enfermedad (*L. major*, *L. brasiliensis*...), las *Leishmania* del complejo *donovani* presentan una capacidad de diseminarse al conjunto de los órganos profundos en los que se multiplican. Los pacientes afectados por LV presentan entonces un cuadro clínico que asocia una fiebre moderada pero persistente, una hepatoesplenomegalia y una pancitopenia que conduce generalmente a la muerte si no se inicia ningún tratamiento específico con suficiente rapidez.

Los cánidos salvajes y los perros son las principales reservas de *L. chagasi* en América Central y Sudamérica, y de *L. infantum* en la cuenca mediterránea, extendiéndose a determinadas regiones de Oriente Medio y Asia. En estas regiones forzosamente endémicas para la leishmaniosis canina, la incidencia de la enfermedad en el ser humano es muy baja.

Aunque la LV es un problema importante en el sur de Europa con la extensión de la pandemia del SIDA y la aparición de un número creciente de coinfecciones por *Leishmania*/VIH, está lejos de estar controlada y se vuelve muy preocupante como problema de salud pública. En otras partes del mundo concretamente en las zonas de

endemia por *L. donovani*: se estima que es de aproximadamente 1/5 de la población en Sudán y en la India donde epidemias letales han causado cientos de miles de víctimas estas últimas décadas. Además la situación se vuelve crítica en la India con la aparición de cepas resistentes a los antimoniados pentavalentes (medicamentos de primera línea).

- 5 El control de las leishmaniosis pasa necesariamente por la quimioterapia. Esta última se pone desgraciadamente en peligro por tratamientos largos, tóxicos y molestos acompañados de numerosos casos de recidiva y por la aparición de fenómenos de quimiorresistencia. Actualmente parece evidente que el control de esta endemia parasitaria dependerá del descubrimiento de nuevos medios de prevención y de tratamientos abordables para las poblaciones afectadas, siendo la vacunación el medio más adaptado.
- 10 El hecho de poder inducir una inmunidad adquirida a la reinfección en un individuo que se había infectado voluntariamente con parásitos vivos ha mostrado muy rápidamente que la vacunación contra estas parasitosis era posible, al menos para las formas cutáneas de leishmaniosis. Estas prácticas, también denominadas leishmanización, usadas durante mucho tiempo en Oriente Medio, Irán y la antigua URSS, se han abandonado posteriormente debido a su peligrosidad.
- 15 Entre los candidatos de vacunas propuestos durante estas últimas décadas, se distinguen cronológicamente las vacunas de primera generación que usan los promastigotes vivos, muertos o atenuados que en el ratón han proporcionado resultados más que mitigados. Después, más recientemente, la llegada de las técnicas de biología molecular ha permitido el desarrollo de vacunas con subunidades o constituidas por proteínas recombinantes, tales como GP63, GP46, lipofosfoglicano (LPG), ..., principalmente recombinantes de proteínas principales expuestas en la superficie de los parásitos. Algunas de esas proteínas recombinantes han conferido un buen nivel de protección contra una infección experimental en el ratón. Finalmente, existen las vacunas de tercera generación que recurren a la genómica funcional y usan transgenes como microorganismos transfectados con el gen de la GP63 y *Leishmania* recombinantes de virulencia atenuada o vacunas de ADN.
- 20

Con respecto a estos trabajos se constatan tres puntos:

- 25 - la vacunación contra las leishmaniosis cutáneas ha sido objeto de numerosos estudios en comparación con los que se refieren a la leishmaniosis visceral. No obstante, los modelos de infección experimental para la leishmaniosis visceral son más difíciles de poner en práctica (concretamente a causa de la dificultad de infectar experimentalmente a los roedores).
- 30 - se han obtenido resultados algunas veces extremadamente interesantes en el ratón. Pero es difícil y peligroso trasladar directamente resultados obtenidos en el ratón a modelos de infección natural de la leishmaniosis (perro, ser humano). Los trabajos de Dunan *et al.* realizados en 1989 son un ejemplo muy demostrativo de ello. Estos autores obtuvieron una protección muy buena en el ratón contra una infección de prueba por *L. infantum* usando una fracción antigénica denominada LiF2. Esta misma fracción, inyectada en perros, no sólo no los protegía sino que, lo que es más grave, aumentaba su susceptibilidad a la infección
- 35 - pocos candidatos de vacuna han superado la fase experimental (ratones, hámsteres) debido a la dificultad de poner en práctica ensayos clínicos largos, costosos y dificultosos.

- 40 Por tanto, cuando no se trata de estudios sobre la leishmaniosis cutánea sino sobre la leishmaniosis visceral, los principales trabajos relativos a la vacunación se han realizado, y siguen realizándose, en el ratón. No obstante, estos modelos de infección experimental no son relevantes porque están muy alejados de los huéspedes naturales de la infección, es decir el perro y el ser humano, huéspedes que tienen un impacto considerable en cuanto a la salud veterinaria y humana. Además, tal como se indicó anteriormente, estos trabajos sólo se refieren prácticamente a una leishmaniosis cutánea y concretamente *L. major* (modelo principal de infección disponible en el ratón), para la cual los estudios no pueden trasladarse a la leishmaniosis visceral.

- 45 Por tanto, la dificultad para alcanzar el objetivo de la presente invención es por una parte realizar un estudio sobre la leishmaniosis visceral; y por otra parte obtener resultados que puedan trasladarse con eficacia e inocuidad al perro y al ser humano.

Para poder usarse en un huésped natural, una vacuna contra la leishmaniosis debe satisfacer varios criterios generales:

- 50 - presentar una buena inocuidad (ausencia de toxicidad local y general del candidato de vacuna, ausencia de toxicidad asociada a la respuesta inmunitaria inducida).
- conferir un nivel de protección excelente en un huésped natural de la infección. El conjunto de los trabajos de investigación que se refieren a la inmunología de las leishmaniosis concuerda en decir que la polarización de las respuestas inmunitarias hacia una vía de tipo Th1 es responsable del estado de protección.

- tener un bajo coste. Las leishmaniosis son enfermedades parasitarias denominadas “despreciadas” ya que afectan a las poblaciones de los países más pobres. Por tanto es importante hacer que los nuevos medios de prevención estén accesibles a las poblaciones afectadas.

5 - presentar una buena estabilidad para una diseminación máxima de la vacuna en los países pobres en los que causa estragos principalmente la leishmaniosis.

- tener una buena viabilidad industrial. Una vacuna sintética con todas las ventajas industriales con respecto a la producción de una vacuna que necesita el cultivo en gran cantidad de los parásitos.

También deberán tenerse en cuenta otros dos criterios de elegibilidad más particulares:

10 - la capacidad que presenta una vacuna de inducir respuestas inmunitarias que permitan distinguir en una zona de endemia un huésped vacunado de un huésped infectado. En efecto, al igual que para numerosas enfermedades parasitarias, el diagnóstico clínico sigue siendo aleatorio ya que los síntomas son poco específicos, con frecuencia ausentes (existen numerosos portadores asintomáticos) y sólo aparecen realmente durante una fase muy avanzada de la infección, que se vuelve entonces extremadamente difícil de tratar. El diagnóstico serológico que consiste en
15 poner en evidencia anticuerpos específicos circulantes se practica de manera rutinaria (técnica de inmunofluorescencia indirecta). Una vacuna, cuando se ha administrado, genera en general anticuerpos específicos que con mucha frecuencia también pueden producirse durante una infección. La presencia de tales anticuerpos en un huésped puede entonces llevar a confusión en el sentido en el que la infección y la vacunación presentan la misma firma.

20 - la ventaja de conferir una inmunoprotección cruzada para las diferentes leishmaniosis. El hecho de seleccionar como vacuna uno o varios antígenos comunes a todas las especies de *Leishmania* deberá sin ninguna duda representar una auténtica ventaja en cuanto a la vacunación cruzada.

La presente invención responde notable y ventajosamente al conjunto de estas condiciones.

25 Recientemente, se ha propuesto un candidato de vacuna compuesto por antígenos de excreción-secreción (AES) de promastigotes de *L. infantum* formulado con el dipéptido muramilo (patente FR 2825633). Un ensayo de vacunación en el perro ha permitido establecer un modelo de estudio inmunitario *in vivo* con *Leishmania infantum* en el perro, huésped de reserva natural de la leishmaniosis visceral. En efecto es naturalmente receptivo al ciclo de *L. infantum/chagasi* y representa una posible fuente de parásitos transmisibles al ser humano. Los estudios de inocuidad en el perro (fase I) han mostrado una muy buena tolerancia local y general del candidato de vacuna. No se
30 ha revelado ninguna toxicidad asociada a la respuesta inmunitaria inducida a lo largo de los diferentes protocolos de inocuidad. La evaluación de su eficacia ha mostrado que confería el 100% de protección frente a la infección de prueba (fase II, Lemesre *et al*, Vaccine 23, 2005, 2825-2842) y, de manera notable, protegía a los perros sometidos a la infección natural de dos estaciones de transmisión en una zona de endemia (estudio referido a 414 perros procedentes de 18 clínicas veterinarias) con un porcentaje de eficacia próximo al 90% (fase III, Lemesre *et al*, Vaccine 25, 2007, 4223-4234).

35 La vacunación mediante los AES no sólo controla el desarrollo de la enfermedad sino que también disminuye significativamente la carga parasitaria en el perro y por tanto contribuye a la interrupción de la transmisión de las *Leishmania*.

40 El conjunto de los resultados respalda por tanto muy sólidamente el hecho de que el candidato de vacuna (combinación de los AES de promastigotes de *L. infantum* con el adyuvante MDP) protege al perro frente a la leishmaniosis visceral por *L. infantum* induciendo de manera duradera una polarización de la respuesta de mediación celular hacia un perfil de tipo Th1 que conduce a la producción de IFN- γ , que puede activar el macrófago e inducir la producción de monóxido de nitrógeno (NO) que provoca la muerte de los amastigotes intracelulares mediante apoptosis (patentes FR 2825633 y WO 2004011500).

45 En paralelo a los ensayos inmunoprolácticos, ensayos inmunoterápicos han proporcionado resultados prometedores (patente WO2004011500). Los perros vacunados inducían una respuesta de anticuerpos específica y duradera de isotipo IgG2, de título bajo y principalmente dirigida contra un inmunógeno principal de 54 kDa en comparación con el grupo de placebo. Se ha identificado mediante ingeniería genética que el inmunógeno principal de los AES pertenece a la familia del “promastigote surface antigen” (“antígeno de superficie de promastigote”), también denominado PSA.

50 Estos últimos se caracterizan por la presencia de un motivo de repetición rico en leucina (“Leucine Rich Repeat”, “repetición rica en leucina”, LRR) y de una parte carboxilo-terminal rica en residuos de serina/treonina.

Se conoce el documento de Lohman/Mc Mahon Pratt (1990) PNAS 87: 8393-8397, que se refiere a la clonación y secuenciación del gen que codifica para la proteína nativa GP46/M2 de la forma promastigota de *Leishmania*

amazonensis, y señala su implicación en la inmunización contra las leishmaniosis concretamente de forma cutánea, en modelos experimentales murinos.

Este documento observa que la proteína nativa GP46 conserva una conformación en el espacio terciaria o cuaternaria, y es inmunoprotectora en el ratón en un modelo cutáneo de leishmaniosis. Esta observación conduce naturalmente al investigador a pensar que esta conformación particular está implicada en el carácter inmunodominante de la proteína. Por otro lado se han realizado investigaciones en este sentido, como consecuencia de dicho documento: Sjölander *et al.* (1998) PH: S0264-410X/98. Este estudio ha permitido observar que la proteína GP46, producida de forma recombinante en un sistema bacteriano (*E. coli*), sistema que no tiene en cuenta las estructuras, ya no es protectora y pierde su eficacia.

Lógicamente, esto conduce a pensar que la conformación en el espacio, secundaria, terciaria o cuaternaria, de la proteína GP46, es importante en la eficacia protectora de dicha proteína.

Ahora bien, en contra de esas publicaciones; los inventores de la presente solicitud han continuado sus trabajos con péptidos de síntesis, que debido a su tamaño y su método de preparación sólo pueden presentar ventajas.

El interés de tales péptidos es evidentemente múltiple: evita los problemas asociados con el aislamiento de secuencias peptídicas, reduce el coste y el tiempo de puesta en práctica de esta operación y por tanto aumenta la productividad con un ahorro económico evidente, permite controlar los riesgos de infección. Tales péptidos responden de manera notable al conjunto de las condiciones mencionadas anteriormente: vacuna estable a bajo coste y eficaz, adaptada a los países pobres en los que causa principalmente estragos la leishmaniosis.

Aunque inicialmente se identificó el PSA (PSA-2) en las formas promastigotas, diferentes estudios parecen indicar que también está presente en la forma amastigota. Además, recientemente se ha demostrado que este PSA incluso se excretaba-secretaba por las dos fases parasitarias principales y presentaba propiedades inmunológicas notables en el sentido en el que perros inmunizados con AES de promastigotes de *L. infantum* podían inducir una respuesta de anticuerpos específica de isotipo IgG2 específicamente dirigida contra el PSA excretado-secretado (patente WO2004011200).

En la *Leishmania* no se le ha atribuido ningún papel biológico funcional mientras que en otros patógenos, tales como las bacterias, proteínas de LRR tales como InlB, Yop y SspH participan en la virulencia y la patogenicidad de esos organismos (Marino *et al.*, 2000. PNAS. 97(16):8784-8788).

Resulta notable que, en las plantas, intervienen en la resistencia frente a diferentes patógenos. Muy recientemente, los estudios sobre la implicación del PSA ("Promastigote Surface Antigen") de las *Leishmania* a nivel de la adhesión celular (Kedzierski *et al.*, 2004, J Immunol., 172: 4902-6), de la resistencia de los parásitos frente a la lisis mediante el complemento (Lincoln *et al.*, Mol Biochem Parasitol. 2004, 137:185-9) y su expresión diferencial a lo largo del ciclo de vida de las *Leishmania* (Handman *et al.*, 1995, Inf. Immun., 63:189-200) han tendido a mostrar que el PSA constituye un componente vital y esencial para el desarrollo de las *Leishmania*.

El PSA-2 nativo de *L. amazonensis* confiere en el ratón un buen nivel de protección contra una infección experimental por *L. major* induciendo una inmunidad protectora de mediación celular de tipo Th1 (Handman *et al.*, 1995. Infect. Immun. 63:4261-4267). Por el contrario, una proteína PSA recombinante producida en un sistema de expresión bacteriano no confiere esta protección, lo que sugiere que las modificaciones postraduccionales de la proteína constituyen una etapa indispensable para su actividad protectora (MacMahon Pratt, 1996).

Más recientemente, el uso de un par de péptidos (en forma de lipopéptidos) de 16 aminoácidos cada uno confiere en el perro, contra una infección de prueba, una inmunoprotección similar a la desarrollada durante la inmunización con los AES. Los perros así vacunados presentan una respuesta de mediación celular frente a *Leishmania infantum* (patente FR n.º 01/11942).

Por el contrario, esta vacuna peptídica formada por 2 péptidos no puede generar una respuesta de anticuerpos específicos IgG2 importante que permitan distinguir en una zona de endemia un huésped vacunado de un huésped no vacunado pero infectado. Otras soluciones al problema de la inmunización contra la *Leishmania* se han propuesto en los documentos WO 200605823 y WO 03025012.

La presente invención permite responder ventajosamente a este inconveniente principal concretamente gracias a un péptido de síntesis no nativo ciclado mediante puente disulfuro.

Este péptido puede usarse en vacunación solo o en asociación con otros péptidos.

No obstante, según un modo preferido de realización de la invención, es cuando se usa en asociación con los dos péptidos de síntesis no nativos descritos en la patente FR 2839767 y con un adyuvante que induce preferiblemente una respuesta de mediación celular, cuando se obtienen resultados óptimos en vacunación. Los resultados de las pruebas realizadas en vacunación se expondrán posteriormente.

Esta mezcla de tres péptidos y de un adyuvante forma un complejo inventivo que permite responder con una gran eficacia a los inconvenientes e insuficiencias de los modelos propuestos anteriormente.

Debe observarse que la forma ciclada de dicho péptido es primordial en la eficacia del complejo según la invención. Los estudios realizados por los inventores han podido en efecto establecer que la forma no ciclada de este péptido sólo induce una estimulación de Th1 muy parcial y presenta una eficacia netamente insuficiente, tanto si el péptido se usa solo como en asociación con otros péptidos. Los inventores han realizado por tanto estudios con el fin de intentar suplir esta insuficiencia y así han descubierto que la forma ciclada descrita a continuación de dicho péptido proporcionaba las ventajas requeridas.

Según la invención, el péptido ciclado mediante puente disulfuro está compuesto por una secuencia de 34 aminoácidos y se denomina: E34P.

Este péptido de 34 aminoácidos (E34P) está compuesto por la siguiente secuencia (SEQ ID N.º 1):

E-D-E-H-K-G-K-Y-C-R-L-G-N-D-C-R-T-T-E-P-T-T-T-A-T-P-R-G-T-P-T-P-A-P

Este péptido está ciclado mediante puente disulfuro entre la cisteína en la posición 9 y la cisteína en la posición 15.

El péptido E34P puede ventajosamente inducir una respuesta de anticuerpos importante que permite discriminar en una zona de epidemia un huésped vacunado de un huésped no vacunado pero infectado. Esta ciclación del péptido es esencial para la aparición de los anticuerpos específicos IgG2, induciendo la ciclación con puente disulfuro entre las cisteínas 9 y 15 una conformación específica responsable de esta síntesis de IgG2. En efecto, la ausencia de ciclación del péptido en Cys 9/ Cys 15 sólo induce una síntesis poco importante de IgG2 algunas veces difícil de descubrir.

Según el modo de realización preferido de la invención, el péptido E34P según la invención se mezcla con un segundo y un tercer péptidos de síntesis no nativos, cada uno compuesto por una secuencia de 16 aminoácidos respectivamente denominada: A16E y A16G, o por derivados de los mismos, así como con un adyuvante.

Por "derivados de las secuencias A16E o A16G" se entiende el conjunto de los análogos estructurales de los aminoácidos constitutivos de dichas secuencias, conocidos y considerados como tales por el experto en la técnica.

El péptido de 16 aminoácidos A16E está compuesto por la siguiente secuencia (SEQ ID N.º 2):

A-A-R-C-A-R-C-R-E-G-Y-S-L-T-D-E

en la que C puede sustituirse por S y L por I.

El péptido de 16 aminoácidos A16G está compuesto por la siguiente secuencia (SEQ ID N.º 3):

A-A-S-S-T-P-S-P-G-S-G-C-E-V-D-G

en la que C puede sustituirse por S y L por I.

Estos dos últimos péptidos pueden inducir una estimulación de los linfocitos T de tipo Th1 que garantiza la protección contra la leishmaniosis visceral.

Asociado a un adyuvante que induce preferiblemente una respuesta de mediación celular, un triplete de péptidos de este tipo presenta todas las ventajas mencionadas anteriormente (sin cultivo, protección en un huésped natural de la infección, marcador de vacunación, inmunidad cruzada, asequible para las poblaciones afectadas...). El conjunto de péptidos E34P, A16E, A16G y adyuvante forma el complejo de péptidos según la invención.

El adyuvante asociado a estas secuencias peptídicas es preferiblemente QA21, saponina, quil-A o cualquier otro derivado de los mismos conocidos por el experto en la técnica, tal como QS21.

De manera preferida, las secuencias peptídicas E34P, A16E y A16G están asociadas en una razón E34P/A16E/A16G: 10/25/25.

El complejo peptídico según la invención induce ventajosamente una producción importante de anticuerpos de isotipo IgG2 específicos del péptido E34P, lo que permite de manera notable distinguir los individuos vacunados de los individuos infectados no vacunados.

La presente invención se refiere por otro lado al uso de las tres secuencias peptídicas E34P, A16E y A16G como reactivos que inducen una estimulación de los linfocitos T de tipo Th1, concretamente para la prevención y el tratamiento de afecciones asociadas a estado de hiperestimulación inmediata y como reactivos de diagnóstico *in vitro* que permiten detectar los anticuerpos marcadores de vacunación, es decir, las IgG2 específicas de los

fragmentos peptídicos. La presente invención corresponde a una vacuna sintética de 2ª generación para el perro (la 1ª generación de vacuna canina corresponde al desarrollo de sistema alternativo de antígenos de excreción-secreción AES de promastigotes de *Leishmania infantum*, mencionado anteriormente) adaptable a una fórmula de vacunación humana.

- 5 Las secuencias peptídicas según la invención E34P, A16E y A16G pueden volverse inmunogénicas mediante enlaces con portadores o cualquier otro derivado (moléculas grandes de tipo KLH, lipopéptidos de tipo palmitoilo o derivados) y se administran a los candidatos en presencia de un adyuvante, y preferiblemente QA21. De manera preferible, la razón péptidos/adyuvante está comprendida entre 3/1 y 3/3.

- 10 En el caso de una infección mediante *Leishmania*, los estudios realizados en el perro han permitido determinar la dosis de vacuna óptima de 20 µg de QA21 para 60 µg de péptidos inyectados. Se observa no obstante un comienzo de respuesta a partir de 55 µg de péptidos inyectados.

- 15 El mecanismo de acción del complejo peptídico obtenido según la invención se verifica con ayuda de métodos específicos que demuestran que el complejo peptídico innovador actúa o bien mediante inmunoestimulación del sistema linfocitario de tipo Th1 con producción de IgG2, o bien mediante inmunomodulación de un tipo Th2 hacia un tipo Th1. Por otra parte, el papel neutralizante de las IgG2 específicas se caracteriza por la inhibición de la proliferación de las formas amastigotas o promastigotas de *Leishmania*.

Este estudio del estado inmunitario de tipo Th1 se realiza con perros, tras vacunación y también con perros con leishmaniosis tras tratamiento con este complejo peptídico.

Método de prueba infecciosa:

- 20 La prueba infecciosa consiste en inyectar por vía intravenosa 10^8 promastigotes en fase metacíclica tratados con complemento de perro sano y de $5 \cdot 10^8$ macrófagos peritoneales de perro sano, infectados *in vitro* mediante amastigotes.

Los promastigotes y los macrófagos infectados se diluyen en suero fisiológico estéril para un volumen final de 1,5 ml. Esta mezcla se realiza justo antes de la inyección.

- 25 Se realiza un examen parasitológico a partir de una muestra extraída directamente del perro.

Se realiza un frotis sobre lámina a partir de la punción de médula ósea. Este frotis, una vez fijado con metanol, se colorea mediante May Grümwald Giemsa y se observa con microscopio de inmersión (x 1000).

- 30 Se cultivan extracciones de médula ósea en el medio de cultivo bifásico NNN (Novy and Mac Neal, 1904, 4. Infec. Dis., 1: 1-30) en el que RPMI 1640 con adición del 20% de suero de ternero fetal descomplementado constituye la fase líquida. Se realizan pases ciegos cada de cuatro a seis días. Se observan regularmente los cultivos con microscopio fotónico (x 400) durante 20 min.

Se califican los parasitemias de la siguiente manera:

+/-: formas alargadas-refringentes inmóviles

+: de 1 a 5 formas promastigotas móviles/campos

- 35 ++: > 5 formas promastigotas móviles/campos

+++: cultivo en confluencia.

Puesta en evidencia de una inmunidad de mediación celular de tipo Th1.

Esta puesta en evidencia se realiza según dos técnicas:

- 40 - Titulación de la actividad leishmanicida de los monocitos según el método descrito anteriormente (patente FR 2825633);
- Detección de las IgG2 de perros, específicos del péptido ciclado E34P y de la parte carboxilo-terminal del PSA.

- 45 Esta detección se realiza mediante un método ELISA según la técnica de microtitulación de Kweider *et al.* (J. Immunol, 1987, 138, 299) usando un conjugado anti-IgG2. Para este método, el péptido se biotinila antes del recubrimiento sobre microplacas. Esta unión a moléculas grandes de tipo biotina tiene concretamente el efecto de hacer que el péptido ciclado E34P sea más antigénico. También se usa como antígeno la proteína recombinante que

codifica para la parte carboxilo-terminal del PSA.

En paralelo a este estudio del estado de tipo Th1, se realiza un seguimiento serológico mediante inmunofluorescencia clásica usando láminas recubiertas mediante promastigotes (método de referencia serológico para la leishmaniosis canina).

- 5 La detección de los anticuerpos de isotipo IgG2 específicos del péptido ciclado E34P y de la parte carboxilo-terminal del PSA permite concretamente realizar un seguimiento de la respuesta inmunitaria en mamíferos vacunados o tratados, y por tanto diferenciar los mamíferos infectados o enfermos, de los mamíferos no infectados o no enfermos pero vacunados o tratados, y realizar un seguimiento de la eficacia de una vacunación o de un tratamiento quimioterápico y/o inmunoterápico.
- 10 El péptido ciclado E34P o el complejo de péptidos de síntesis según la invención puede usarse para la fabricación de un medicamento, de una vacuna o de un reactivo de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, para la inducción de la producción de anticuerpos específicos de isotipo IgG2 específicos del péptido ciclado E34P que permite distinguir un mamífero infectado o enfermo, de un mamífero no infectado o no enfermo pero vacunado o tratado, y para la inducción o el diagnóstico en mamíferos de anticuerpos específicos y más particularmente de isotipo IgG2,
- 15 asociados con un estado inmunitario de tipo Th1.

El péptido ciclado E34P o el complejo de péptidos de síntesis según la invención puede acondicionarse en una forma tal que puede administrarse mediante diferentes vías: subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, parenteral y oral.

- 20 También puede usarse como producto de diagnóstico *in vitro* e incluirse en un kit de diagnóstico. En una hipótesis de este tipo, el producto de diagnóstico *in vitro* se caracteriza porque contiene el péptido ciclado E34P o el complejo de péptidos según la invención, para la detección de una respuesta humoral y particularmente de las IgG2, que permite concretamente la puesta en evidencia de un estado inmunitario de tipo Th1 y de un estado de hiperestimulación retardada, el seguimiento de la respuesta inmunitaria en mamíferos vacunados o no vacunados pero tratados, y el seguimiento de la eficacia de una vacunación o de un tratamiento quimioterápico y/o
- 25 inmunoterápico.

- El carácter innovador del complejo peptídico según la invención no se encuentra únicamente en la inducción de una respuesta celular de tipo Th1, sino también en la producción de tasas de anticuerpos de tipo IgG2. Estas IgG2 pueden detectarse mediante diversos métodos *in vitro*, por ejemplo ELISA, inmunotransferencia puntual, inmunotransferencia de tipo Western, inmunocromatografía, látex, fluoróforos y cualquier otro método *in vitro* que haga intervenir un sistema de conjugado u otros sistemas de visualización Ag-Ac.
- 30

En un kit de diagnóstico, los péptidos E34P, A16E o A16G pueden estar unidos a un soporte sólido, y por ejemplo a membranas de nitrocelulosa u otros polímeros, soportes de látex y diversos materiales de plástico (polímero).

Puesta en evidencia del papel neutralizante de las IgG2 específicas:

- 35 Inhibición del crecimiento de los promastigotes y de los amastigotes en presencia de las IgG2 (patente WO 2004011500).

El péptido de síntesis no nativo ciclado E34P induce inmunoglobulinas de clase IgG2 que pueden neutralizar la proliferación de los amastigotes y promastigotes de *Leishmania sp in vitro*.

Resultados e inmunoterapia:

- 40 Según los especialistas tales como PINELLI (PINELLI, E *et al*, Infect Immun, 1994, 62.229-235) los perros con leishmaniosis que corresponden a la activación del sistema linfocitario de tipo Th2 presentan una respuesta de anticuerpos elevada.

Esta producción aumentada de anticuerpos corresponde a la hiperproteinemia e induce la aparición de inmunocomplejos que conllevan una afección renal (aumento de la creatinina y de la urea sanguíneas).

- 45 Por tanto se ha intentado modular hacia un estado de Th1 administrando perros con leishmaniosis completa por vía intradérmica dosis del compuesto peptídico. El seguimiento del estado inmunitario así como la observación clínica se realizan antes y después del tratamiento.

Ejemplo 1: perro SENIOR

- 50 Un perro de raza Braco de Weimar de 6 años de edad, perteneciente al Sr. G presenta numerosas lesiones cutáneas acompañadas por un estado de fatiga general y un aspecto delgado, evocando el conjunto una leishmaniosis canina.

El veterinario, el Dr. GH, diagnostica una leishmaniosis. Este diagnóstico se confirma mediante una observación directa con microscopio de *Leishmania* a partir de un calco cutáneo y un análisis serológico que proporciona un título de inmunofluorescencia de leishmaniosis positivo a 1/1600.

- 5 El análisis del estado inmunitario antes de cualquier inyección permite confirmar que el perro está realmente en un estado inmunitario de tipo Th2 con un título de anticuerpos elevado así como una prueba leishmanicida negativa. Se instaura una inmunoterapia que consiste en realizar, por vía intradérmica, 3 inyecciones de 60 µg de péptidos (25 µg de A16E, 25 µg de A16G, 10 µg E34P) y 20 µg de QA21, dejando pasar 3 semanas entre cada inyección.

Una semana después de la tercera inyección el perro SENIOR recupera el apetito y una cierta vitalidad. El Dr. GH comienza a observar una ligera mejora cutánea.

- 10 Un mes después de la última inyección, SENIOR ha recuperado un aspecto clínico normal concretamente un aumento de peso de 1 kg y una desaparición del 70% de todas las lesiones cutáneas. El análisis del estado inmunitario permite confirmar una bajada del título de anticuerpos anti-*Leishmania* que desciende a 1/400 de inmunofluorescencia. En paralelo, el efecto leishmanicida es positivo. Además, después del tratamiento, el perro SENIOR presenta IgG2 específicas del péptido ciclado E34P y de la parte carboxilo-terminal del PSA, tituladas mediante el método ELISA. Estas IgG2 específicas estaban ausentes antes de cualquier tratamiento.

15 Una búsqueda de parásitos mediante cultivo en medio NNN resulta negativa. 8 meses después del tratamiento el perro SENIOR no presenta ninguna modificación. Los análisis biológicos permiten confirmar que SENIOR sigue estando en estado inmunitario Th1.

Ejemplo 2: Perro THEO

- 20 Un perro macho de raza Epagneul bretón, THEO de 5 años de edad perteneciente al Sr. K, presenta signos clínicos específicos de la leishmaniosis. Según el Dr. DM, hay presencia de numerosas escamas brillantes, depilación periocular derecha, lesiones ulcerosas a nivel del codo posterior derecho y un estado de fatiga pronunciado concretamente con una facies de perro anciano. Los análisis biológicos concretamente con una serología de leishmaniosis positiva a 1/800 de inmunofluorescencia refuerzan el diagnóstico clínico.

- 25 Se instaura una inmunoterapia que consiste en realizar, por vía transdérmica, 3 inyecciones de 60 µg de compuesto de vacuna peptídico (25 µg de A16E, 25 µg de A16G, 10 µg de E34P) y 20 µg de QA21, dejando pasar 3 semanas entre cada inyección. El análisis del estado inmunitario antes de cualquier inyección demuestra que el perro THEO desarrolla un sistema inmunitario de tipo Th2 con una parasitología fuertemente positiva a partir de la médula ósea.

- 30 Un mes después de la última inyección, los signos clínicos de leishmaniosis de THEO retroceden concretamente con una cicatrización de las lesiones ulcerosas, una desaparición importante de las escamas así como una depilación periocular casi inexistente. La serología presenta una bajada de inmunofluorescencia a 1/400. Por el contrario el análisis de la respuesta celular permite confirmar que THEO presenta un estado Th1 activo con un efecto leishmanicida bastante importante.

En paralelo, la parasitología es negativa (cultivo de médula ósea en medio NNN).

- 35 A nivel humoral, el perro THEO presenta IgG2 específicas del péptido ciclado E34P y de la parte carboxilo-terminal del PSA tras el tratamiento, IgG2 tituladas mediante ELISA.

- 40 La presente invención consiste por tanto correctamente en un compuesto peptídico terapéutico que induce el paso de un estado inmunitario de tipo Th2 con producción importante de anticuerpos que exacerba las manifestaciones clínicas hacia un estado inmunitario de tipo Th1 que conlleva la curación y está acompañado por IgG2 específicas concretamente del péptido ciclado E34P.

Resultados de vacunación del complejo peptídico:

- 45 Se somete a prueba el complejo de péptidos en 14 perros distribuidos en 7 grupos, perfectamente sanos que presentan una serología de leishmaniosis negativa, una parasitología negativa, una ausencia de respuesta celular frente a *Leishmania* y una ausencia de IgG2 específicas del péptido E34P ciclado. En el establecimiento de los grupos de perros, se prevé concretamente comparar el complejo peptídico con el péptido E34P ciclado del complejo peptídico con el complejo E34 no ciclado y comparar el péptido E34P ciclado solo con el péptido E34P no ciclado solo.

- 50 Los 14 perros han vivido en el norte de Francia (Auxerre), zona no endémica, y se han distribuido en el sudeste de Francia, cuatro semanas antes de la vacunación en periodo invernal (periodo que no presenta vectores flebotomos para *Leishmania*). Entre los 7 grupos, 2 grupos de perros recibirán el péptido E34P (1 grupo con E34P ciclado y 1 grupo con E34P no ciclado), 3 grupos de perros recibirán la mezcla peptídica (A16E, A16G y E34P ciclado) concretamente con 3 concentraciones diferentes del péptido E34P ciclado. Otro grupo de perros recibirá la mezcla

peptídica (A16E, A16G y E34P no ciclado).

- grupo control (placebos)

Perro n.º 1: Control negativo: beagle macho de 3 años

Perro n.º 8: Control negativo: beagle macho de 3 años

5 - grupo A: perros vacunados con los 3 péptidos y 1 adyuvante con las siguientes concentraciones:

A16E: 25 µg

A16G: 25 µg

E34P ciclado: 25 µg

adyuvante QA21: 20 µg

10 Perro n.º 2: beagle hembra de 8 años

Perro n.º 7: beagle hembra de 7 años

- grupo B: perros vacunados con los 3 péptidos y 1 adyuvante con las siguientes concentraciones:

A16E: 25 µg

A16G: 25 µg

15 E34P ciclado: 10 µg

adyuvante-QA21: 20 µg

Perro n.º 3: beagle hembra de 7 años

Perro n.º 6: beagle hembra de 7 años

- grupo C: perros vacunados con los 3 péptidos y 1 adyuvante con las siguientes concentraciones:

20 A16E: 25 µg

A16G: 25 µg

E34P ciclado: µg

adyuvante QA21: 20 µg

Perro n.º 4: beagle hembra de 9 años

25 Perro n.º 5: beagle hembra de 9 años

- grupo D: perros vacunados con los 3 péptidos y 1 adyuvante con las siguientes concentraciones:

A16E: 25 µg

A16G: 25 µg

E34P no ciclado en puente disulfuro: 10 µg

30 Adyuvante QA21: 20 µg

Perro n.º 9

Perro n.º 10

- grupo E: perros vacunados con 1 péptido E34P ciclado y 1 adyuvante con las siguientes concentraciones:

E34P ciclado: 10 µg

35 Adyuvante QA21: 20 µg

Perro n.º 11

Perro n.º 12

- grupo F: perros vacunados con 1 péptido E34P no ciclado y 1 adyuvante con las siguientes concentraciones:

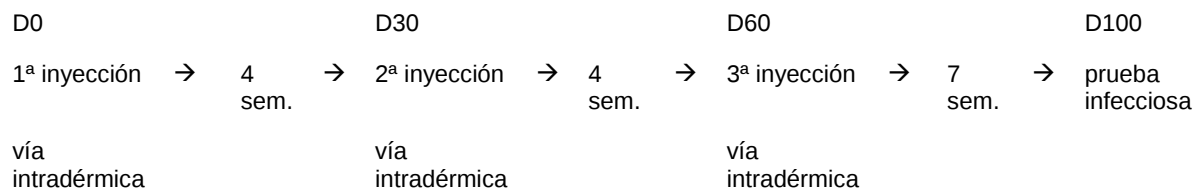
E34P no ciclado: 10 µg

5 Adyuvante QA21: 20 µg

Perro n.º 13

Perro n.º 14

El esquema de inyección de vacuna es el siguiente (sem. = semana):



10

Se realiza un seguimiento clínico de los 14 perros cada 2 semanas.

Se realizan los análisis biológicos:

- antes de cualquier inyección
- 1 mes después de la 3ª inyección.

15 Los análisis biológicos consisten en:

- serología de IgG2 específicas del péptido ciclado E34P y de la parte carboxilo-terminal del PSA;
- serología de leishmaniosis: inmunofluorescencia cuantitativa de las IgG totales (signo de infección);
- actividad leishmanicida de los monocitos (respuesta de mediación celular).

20 Debe añadirse a estos análisis la búsqueda de *Leishmania* mediante observación directa con microscopio y cultivo en medio NNN a partir de médula ósea tras la prueba infecciosa.

Esta búsqueda de *Leishmania* se realiza 4 meses después de la prueba infecciosa.

No aparece ninguna manifestación clínica importante durante todo este estudio.

Antes de cualquier inyección, los 14 perros presentan serologías de IgG totales y parasitologías negativas.

25 El papel de las IgG2 sobre la viabilidad y el crecimiento de los promastigotes y de los amastigotes de *Leishmania* se analiza con inmunosueros de perros vacunados con la mezcla que comprende el péptido E34P ciclado y los sueros de perros tratados con placebo.

Tabla I

Estado inmunitario de los perros tras la vacunación

Parámetros biológicos	Serología ELISA de IgG2 frente a PSA C-ter		Serología ELISA de IgG2 frente a E34P ciclado		Respuesta celular, actividad leishmanicida de los monocitos		IgG totales mediante IFAT	
	Antes	1 mes	Antes	1 mes	Antes	1 mes	Antes	1 mes

Perros		de la vacuna- ción	despu és de la 3ª inyec- ción	de la vacuna- ción	después de la 3ª inyec- ción	de la vacuna- ción	después de la 3ª inyec- ción	de la vacuna- ción	despu és de la 3ª inyec- ción
Grupo placebo	1	0,049	0,088	0,185	0,113	<0%	19,9%	-	-
	8	0,062	0,072	0,120	0,170	<0%	10%	-	-
Grupo A	2	0,052	0,062	0,128	0,350	<10%	71,5%	-	-
	7	0,067	0,350	0,171	1,949	<0%	76,6%	-	-
Grupo B	3	0,049	0,275	0,220	0,938	<10%	81,4%	-	-
	6	0,044	0,595	0,182	1,125	<0%	91,5%	-	-
Grupo C	4	0,056	0,069	0,186	0,269	<0%	70,3%	-	-
	5	0,058	0,059	0,118	0,444	<0%	82,2%	-	-
Grupo D	9	0,040	<u>0,100</u>	0,110	0,224	<0%	84,5%	-	-
	10	0,038	0,150	0,192	<u>0,287</u>	<0%	90,1%	-	-
Grupo E	11	0,031	0,080	0,162	0,250	<0%	30,5%	-	-
	12	0,058	0,065	0,175	0,399	<0%	52,7%	-	-
Grupo F	13	0,041	0,073	0,182	0,125	<0%	31%	-	-
	14	0,045	0,058	0,129	0,170	<0%	28,7%	-	-

Leyenda: - ELISA de IgG2: punto de corte = 0,110 para PSA C-ter

punto de corte = 0,290 para el péptido E34P ciclado (en densidad óptica)

- Actividad leishmanicida de los monocitos: expresada en porcentaje de inhibición del índice parasitario (patente FR 01/07606): punto de corte = 40%

- IgG totales IFAT: punto de corte $\geq 1/100$ (inmunofluorescencia indirecta)

Recuadros en negrita = resultados positivos

Cifras subrayadas = resultados ligeramente positivos

Según la tabla I, el complejo de 3 péptidos concretamente con 10 μ g del péptido ciclado E34P (grupo B: perros 3 y 6) induce correctamente una inmunidad celular de tipo Th1 con inducción de anticuerpos de isotipo IgG2 específicos. El péptido ciclado E34P solo únicamente induce una respuesta parcial. El péptido E34P no ciclado es menos eficaz que el E34P ciclado.

Tabla II

Serología de IgG totales y parasitemias realizadas, 4 meses después de la prueba infecciosa.				
Perros		Serología de IgG totales (IF cuantitativas)	Parasitología (en punciones de médula)	
			Examen directo	Cultivo en medio NNN
Grupo placebo	1	1/100	-	++
	8	1/100	+	++
Grupo A	2	-	-	-

	7	-	-	-
Grupo B	3	-	-	-
	6	-	-	-
Grupo C	4	-	-	-
	5	-	-	-
Grupo D	9	1/100	-	+/-
	10	-	-	-
Grupo E	11	1/200	-	+/-
	12	-	-	-
Grupo F	13	1/100	+	+
	14	1/100	-	+/-
Leyenda: IF = Inmunofluorescencia (considerada positiva si el título es $\geq 1/100$) Parasitología = cultivo en medio NNN - = ausencia +/- = formas alargadas refringentes inmóviles poco frecuentes + = de 1 a 5 formas promastigotas móviles/campo ++ = más de 5 formas promastigotas móviles/campo +++ = cultivo en confluencia				

Según la tabla II, el complejo de los 3 péptidos con el péptido ciclado E34P y el adyuvante induce correctamente un estado inmunitario de tipo Th1 protector: ausencia de parásitos y de IgG totales cuatro meses después de la prueba infecciosa, concretamente para los perros 3 y 6 del grupo B (perros inmunizados con 10 µg de E34P, 25 µg de A16E y 25 µg de A16G).

Por otra parte, el péptido solo E34P ciclado no es suficiente para inducir una respuesta eficaz, por otra parte los resultados de la tabla II se correlacionan con los de la tabla I en lo que se refiere a la diferencia de los péptidos E34P y E34P no ciclado: la estructura ciclada del péptido E34P parece esencial.

Tabla III

10 Porcentaje de inhibición del crecimiento parasitario mediante sueros de perros tratados con placebo y vacunados (dilución $\frac{1}{4}$) establecidos al 5º día de cultivo

Perros	1	3	6
Respuestas a diferentes tiempos	(Grupo placebo)	(Grupo B)	(Grupo B)
Antes de la inmunización	3,4%	5,8%	<0
Después de la inmunización	4,4%	73,4%	84,3%

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta de IgG2 anti-vacuna de los perros vacunados con la

formulación de 3 péptidos con el péptido ciclado E34P no sólo acompaña a la inmunidad protectora sino que también ejerce una actividad anti-parasitaria.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ORIDAN INC.

5 <120> Péptido de síntesis no nativo ciclado y complejo de péptidos que comprende dicho péptido ciclado

<130> B118 12PCT 06

<150> FR 08/03436

<151> 19-06-2008

<160> 3

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 34

<212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

15 <400> 1

```

Glu Asp Glu His Lys Gly Lys Tyr Cys Arg Leu Gly Asn Asp Cys Arg
1      5      10      15
Thr Thr Glu Pro Thr Thr Thr Ala Thr Pro Arg Gly Thr Pro Thr Pro
20      25      30
Ala Pro

```

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

20 <213> *Leishmania sp.*

<400> 2

```

Ala Ala Arg Cys Ala Arg Cys Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Glu
1      5      10      15

```

<210> 3

<211> 16

25 <212> PRT

<213> *Leishmania sp.*

<400> 3

Ala Ala Ser Ser Thr Pro Ser Pro Gly Ser Gly Cys Glu Val Asp Gly
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Péptido de síntesis no nativo ciclado destinado a inducir una producción importante de anticuerpos específicos de isotipo IgG2 que permite distinguir en caso de afecciones asociadas a estado de hiperestimulación de tipo retardado, un animal o ser humano infectado o enfermo, de un animal o ser humano no infectado o no enfermo pero vacunado o tratado, caracterizado por la siguiente secuencia de aminoácidos (E34P) (SEQ ID N.º 1):
E-D-E-H-K-G-Y-C-R-L-G-N-D-C-R-T-T-E-P-T-T-A-T-P-R-G-T-P-T-P-A-P
estando dicha secuencia ciclada por puente disulfuro entre la cisteína en la posición 9 y la cisteína en la posición 15.
2. Complejo de péptidos de síntesis no nativos destinado a inducir y a caracterizar la prevención y/o el tratamiento de afecciones en mamíferos cuya inmunidad protectora depende de la estimulación de los linfocitos de tipo Th1, y concretamente de un estado de hiperestimulación de tipo retardado, caracterizado porque contiene:
- la secuencia ciclada (E34P) según la reivindicación 1;
- y la siguiente secuencia (A16E) de 16 aminoácidos (SEQ ID N.º 2) o derivados (análogos estructurales) de la misma:
A-A-R-C-A-R-C-R-E-G-Y-S-L-T-D-E
en la que C puede sustituirse por S y L por I;
- y la siguiente secuencia (A16G) de 16 aminoácidos (SEQ ID N.º 3) o derivados (análogos estructurales) de la misma:
A-A-S-S-T-P-S-P-G-S-G-C-E-V-D-G
en la que C puede sustituirse por S y L por I;
- y un adyuvante que induce preferiblemente una respuesta de mediación celular.
3. Complejo de péptidos de síntesis según la reivindicación 2, caracterizado porque el adyuvante es QA21, saponina, quil-A o cualquier otro derivado de los mismos conocido por el experto en la técnica, tal como QS21.
4. Complejo de péptidos de síntesis según la reivindicación 2 ó 3, caracterizado porque las secuencias peptídicas E34P, A16E y A16G están unidas en una razón E34P/A16E/A16G: 10/25/25.
5. Uso del péptido E34P según la reivindicación 1 o del complejo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para la fabricación de un medicamento, o de una vacuna, o de un reactivo de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, para la inducción o el diagnóstico en un mamífero de anticuerpos específicos y más particularmente de isotipo IgG2, asociados con un estado inmunitario de tipo Th1.
6. Complejo de péptidos de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque los péptidos E34P, A16E y A16G están unidos a portadores (moléculas grandes de tipo KLH, lipopéptidos de tipo palmitoilo o derivados) para hacer que sean inmunógenos.
7. Complejo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 ó 6, acondicionado en una forma tal que puede administrarse mediante diferentes vías: subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, parenteral y oral.
8. Uso del péptido de síntesis no nativo ciclado E34P destinado a inducir inmunoglobulinas de clase IgG2 según la reivindicación 1 para neutralizar *in vitro* la proliferación de los amastigotes y promastigotes de *Leishmania sp.*
9. Producto de diagnóstico *in vitro* caracterizado porque contiene el péptido ciclado E34P según la reivindicación 1, o el complejo de péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 ó 6, para la detección de una respuesta humoral y particularmente IgG2, que permite concretamente la puesta en evidencia de un estado inmunitario de tipo Th1 y de un estado de hiperestimulación retardada, el seguimiento de la respuesta inmunitaria en mamíferos vacunados o no vacunados pero tratados, y el seguimiento de la eficacia de una vacunación o de un tratamiento quimioterápico y/o inmunoterápico.

10. Kit de diagnóstico *in vitro* que comprende el producto de diagnóstico según la reivindicación 9, caracterizado porque el péptido ciclado E34P o el complejo de péptidos está unido a un soporte sólido.
11. Kit de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 10, caracterizado porque el péptido ciclado E34P o el complejo de péptidos está unido a membranas de nitrocelulosa u otros polímeros, soportes de látex y materiales de plástico (polímero).

5