

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 99.923

**REQUERENTE:** BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã,  
com sede em D-3550 Marburg, República  
Federal Alemã

**EPÍGRAFE:**"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS HÍBRIDAS  
DE PLASMODIUM FALCIPARUM QUE CONTÊM SEQUÊNCIAS  
DOS ANTIGÉNIOS DA MALÁRIA HRPII E SERP E DE  
COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ESTAS  
PROTEÍNAS"

**INVENTORES:** Dr. Bernhard Knapp, Dr. Erika Hundt,  
Dr. Burkhard Enders e Dr. Hans Krüpper

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.

República Federal Alemã em 24 de Dezembro de 1990 sob o  
Nº P 40 41 836.7



Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Bernhard Knapp, Dr. Erika Hundt, Dr. Burkhard Enders e Dr. Hans Krüpper, residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS HÍBRIDAS DE PLASMODIUM FALCIPARUM QUE CONTÊM SEQUÊNCIAS DOS ANTIGÊNIOS DA MALÁRIA HRPII E SERP E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ESTAS PROTEÍNAS".

### Descrição

A presente invenção refere-se a proteínas híbridas constituídas por sequências parciais dos antigênicos da malária HRPII e SERP. A sequência HRPII já demonstra capacidade de protecção em modelos com símios (EP-A2-0 315 085), sendo utilizado na presente invenção bem como nas experiências profiláticas que a precederam um domínio C-terminal de 189 ácidos aminados. A sequência SERP foi identificada com o auxílio de um anti-soro (EP-A1-0 283 882); a sequência parcial utilizada (ácidos aminados (AA) 631 a 892 e 630 a 764 contém pelo menos dois epítomos de células T (Roussilhon et al., (1990), Immunol. Letters 25, 149-154). De acordo com as formas de concretização preferidas, integram-se outros domínios de outras pro-

J.M.

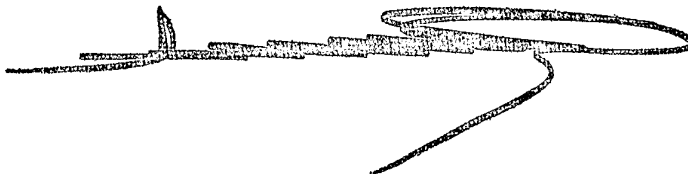
teínas de *P. falciparum* que contêm epítomos de células T com o "antigénio superficial dos merozoítos I" (Merozoite Surface Antigene) MSA I ou também "antigénio de 195 kd"), ácidos aminados de 100 a 300) (Crisanti et al. (1988), Science 240, 324-326). Ao alto grau de conservação das sequências peptídicas é uma propriedade de todos os componentes híbridos. Por vacinação com as proteínas híbridas referidas obtém-se uma protecção contra uma infecção por malária.

Tendo em conta o significado da malária como uma das doenças tropicais mais amplamente difundidas, é de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina activa contra esta enfermidade. As vacinas podem ser dirigidas contra os esporozóitos, contra os merozóitos ou contra os gametocitos dos plasmídios (*P.*), sendo seleccionados neste caso antigénios do estágio sanguíneo assexuado (merozóitos) do *P. falciparum*.

As sequências nucleotídica e proteica da sequência SERP encontram-se descritas no pedido de Patente Europeia EP-A1-0 283 882 como sequência para a "proteína de 140 kd". A sequência HRPII encontra-se descrita no pedido de Patente Europeia EP-A2-0 315 085; a sequência de ácidos nucleicos e a proteína codificada por aquela são apresentadas no Quadro 2 daquele pedido de Patente. Por fim, no Pedido de Patente Europeia EP-A1-0254862 descreve-se uma sequência parcial do MSA I sob a designação de antigénio 31-1 ou de proteína parcial do antigénio de 195 kd (ver Fig. 1 no mesmo pedido de Patente).

É portanto surpreendente que as proteínas híbridas da presente invenção exerçam um efeito protectoro intensificado em comparação com as referidas proteínas isoladamente (Figs. 1 a 4). Por exemplo, para as proteínas híbridas da presente invenção utilizaram-se os produtos de expressão de duas construções:

1. MS2/SERP/HPR II (contém os AA de 631 a 892 do antigénio SERP) e
2. SERP/MSA I/HPR II (contém os AA de 140 a 254 da sequência



do MSA I e os AA 630 a 764 do antigénio SERP), que são apresentadas esquematicamente na Fig. 5. As proteínas de fusão abrangem neste caso pelo menos dois epítomos de células T. Adicionalmente ao efeito protector sinérgico da utilização das proteínas híbridas da presente invenção, há que verificar quais os processos de purificação destas construções híbridas bicomponente, tricomponente ou oligocomponente, uma vez que apenas num único processo de purificação se obtêm vários componentes de uma vacina da malária de alta actividade. Uma vacina multicomponente reduz adicionalmente o risco de a vacina se tornar inactiva em virtude da ocorrência de mutações do agente vector.

Nos exemplos que se seguem descreve-se mais completamente a presente invenção, sendo a invenção elucidada por meio da descrição das construções MS2/SERP/HRP II e SERP/MSA I/HRP II, que não devem ser consideradas como limitação do respectivo âmbito. A presente invenção é finalmente de finida por meio das reivindicações.


#### **Exemplos:**

##### **Exemplo 1:**

##### **Descrição dos plasmídeos de partida**

Para a construção dos antigénios híbridos MS2/SERP/HPR II e SERP/MSA I/HPR II usaram-se os seguintes plasmídeos:

- pUC-SERP: o vector pUC 18 contém um fragmento XbaI genómico de 5,6 kb, que inclui o gene SERP completo (EP-A1-0 283 882; B. Knapp et al., (1989) Mol. Biochem. Parasitol. 32, 73 - 84).
- pUC-HRPII: o vector pUC 18 contém um fragmento de 600 pb que codifica para a fracção C-terminal da proteína HRPII (EP-A2- 0 315 085; B. Knapp et al., (1988) Behring Inst. Mitt. 82, 349 - 359).

- 
- pEX-32-11rd: o vector pEX 31b contém um fragmento de 600 pb que codifica para a fração N-terminal do antigénio MSA I com supressão de uma sequência repetitiva (EP-A-o 254 862).
  - pEX31: vector de expressão que expressa, sob regulação do promotor PL do fago lambda, 99 ácidos aminados N-terminais da polimerase do bacteriófago MS2, ao qual é possível fundir uma proteína estranha (K. Strebel et al. (1986) J. Virol. 57, 983 - 991).
  - pTRC99: vector de expressão que pode expressar uma proteína estranha sob regulação do promotor tac (E. Amann et al. (1988) Gene 69, 301 - 315).

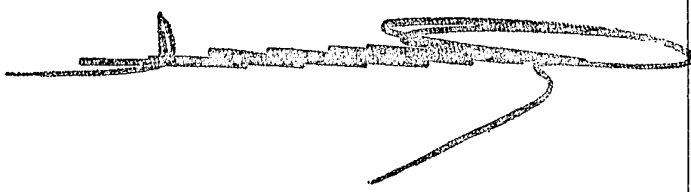
## **Exemplo 2**

### **Construção do antigénio híbrido MS27/SERP/HRPII**

Digeriu-se o plasmídeo pUC-SERP com as enzimas de restrição EcoRI e PstI, tendo sido possível isolar um fragmento de 787 pb do gene SERP segundo métodos habituais (J. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EUA). Ligou-se este fragmento de ADN entre os locais de restrição EcoRI e PstI do vector pEX31b. Transformaram-se células POP 21236 (firma Stratagene) que possuíam no seu cromossoma o gene CI 537, e investigaram-se colónias isoladas a fim de determinar a respectiva capacidade para expressão da sequência de ADN específica dos parasitas sob a forma de proteínas de fusão MS2-polimerase após indução pelo calor de acordo com métodos conhecidos (B. Knapp et al., 1988 supra). As colónias isoladas que possuem integrado o fragmento de ADN no vector pEX31b exprimem uma proteína de fusão MS2-polimerase de 40 kD a qual contém os ácidos aminados 631 a 892 do antigénio SERP. Esta região contém dois epítomos de células I entre as posições dos ácidos aminados 640 e 700 (C. Roussilhon et al. (1990) supra) e uma região desde a posição do ácido aminado 745 até à posição do ácido aminado 787 que é homóloga em sequência de

consenso da proteinase de cisteína (Higgins et al., (1989), Nature 340, 604).

Numa segunda fase digeriu-se o plasmídeo pUC-HRP<sub>II</sub>, que contém nas extremidades 5' e 3' um local PstI no ADN inserido, com a enzima de restrição HindIII e em seguida incubou-se com a enzima PstI sendo sob condições de digestão parcial (0,05 unidades durante 10 min. a 37°C), a fim de isolar um fragmento de ADN de 600 pg que contém um local PstI na extremidade 5' e um local HindIII (digestão parcial) ou um local PstI (digestão completa) na extremidade 3'. Este fragmento de ADN foi ligado entre os locais PstI e HindIII do plasmídeo pEX31b, o qual contém o fragmento SERP de 787 pb. Neste caso o quadro de leitura do fragmento HRP<sub>II</sub> ligado está em concordância com o do fragmento SERP inserido. Após transformação de células POP 2136 cultivaram-se clones individuais a 28°C em meio LB a que se tinham adicionado 100 µg/ml de ampicilina, e analisou-se o ADN de cada clone por digestão com enzimas de restrição por meio de métodos conhecidos (J. Sambrook et al., supra). Nos clones em que se verificou estarem inseridos os fragmentos de ADN pretendidos provocou-se a expressão por meio de métodos conhecidos (B. Knapp et al., 1988) e procedeu-se a análise por meio de electroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Para este fim as proteínas foram coradas com azul de Coomassie ou transferidas para nitrocelulose, a fim de as detectar com anticorpos dirigidos contra as sequências parciais SERP (B. Knapp et al., 1989, supra) e HRP<sub>II</sub> (B. Knapp et al., 1988, supra) recombinantes. Em contraste com a dimensão derivada da sequência de ácidos aminados de 62 kD, a proteína de fusão tem um peso molecular de 75 kD. A origem deste facto encontra-se no comportamento extraordinariamente variável da fracção de hrp<sub>ii</sub> (B. Knapp et al., 1988, supra). A proteína de fusão contém fracções de três proteínas diferentes: 99 ácidos aminados da MS2-polimerase (AA 1 a 99), 262 ácidos aminados da proteína SERP (AA 100 a 361 ácidos aminados da proteína HRP<sub>II</sub> (AA 364 a 552). As posições dos ácidos aminados



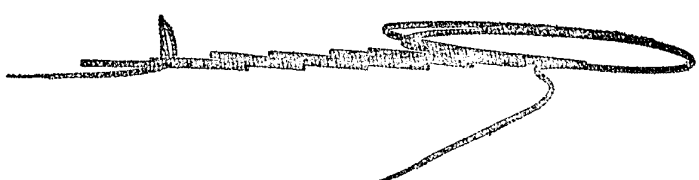
352/363 são codificadas por meio de uma região adaptadora que é originária do procedimento de clonagem. Este gene híbrido utiliza o codão TAA do fragmento da proteína HRPII como o seu codão de paragem natural. A proteína codificada por este gene híbrido reage na análise da mancha de Western com anti-soros que são específicos para as proteínas SERP e HRPII. Este facto confirma que o antigene da proteína híbrida contém determinantes das duas proteínas da malária.

A partir de 5 l da cultura bacteriana induzida purificou-se parcialmente a proteína híbrida por meio de aumento gradual da concentração de ureia de acordo com métodos conhecidos (B. Knapp et al., 1988, supra). A proteína híbrida foi obtida numa solução em ureia 7M e foi dialisada contra ureia 2 M - a concentração mínima de ureia, a fim de conservar a proteína em solução. Imunizaram-se coelhos com as proteínas parcialmente purificadas. Anticorpos dirigidos contra a proteína híbrida reagiram com a proteína SERP e com a proteína HRPII em proporções quase idênticas, conforme foi possível mostrar por meio de análise de mancha de Western com proteínas do esquistozonte de P. falciparum.

### Exemplo 3

#### Construção do antígeno híbrido SERP/MSA I/HRPII

Utilizaram-se os oligonucleótidos p1 (5'-CGTCCCATGGAATTCTTACAAATTATTGAAGAT-3', com um local de restrição NcoI na extremidade 5', complementar às bases 2641 e 12667 do gene SERP) e p2 (5'-TCCTTCECTATTACATAATTACCATAACCAACAATATTAAGTGCATG-3', complementar às bases 2993 a 3045 do gene SERP), bem como 10 ng de ADN do plasmídeo pUC-SERP numa reacção de polimerase em cadeia (PCR). A PCR foi efectuada de acordo com um protocolo padrão utilizando o conjunto Gen amp<sup>R</sup> (da companhia Perkin Elmer Cetus). Desta reacção resultou um fragmento de cerca de 400 pb que codifica para 135 ácidos aminados do gene SERP (AA de 630 a 764) - uma região que contém dois epítomos de células T do antígeno SERP (C. Roussilhon et al.,




1990 supra).

Com o auxílio de uma reacção PCR amplificaram-se 10 ng do ADN do plasmídeo pEX31-1lrs em combinação com os oligonucleotídeos p3 (5'-GGTAATTATGTGAATAGCGAAGGAGAACTCTTTGATTTAACCAATCATATG-3'; os nucleótidos 1 a 18 são complementares das bases 3022 a 3045 do gene SERP e os nucleótidos 19 a 45 são complementares das bases 226 a 252 da sequência parcial 31-1 lrd de MSA I e p4 (5'-GGGGTCGACGGATCCGGTACCAAGCTTACTTCCTTCAATTAATTCATTTATATTTGC-3', complementar das bases 538 a 567 da sequência parcial 31-1 lrd de MSA I com os locais de restrição SaII, BamHI, KpnI e HindIII na extremidade. O fragmento resultante de 360 pb codifica para os 115 ácidos aminados do antígeno MSA I (AA 140 a 254). Trata-se neste caso de um domínio altamente conservado em várias estirpes de P. falciparum que contém dois epítomos de células T (Crisanti et al., 1988 supra).

Submeteram-se aliquotas de 150 ng dos fragmentos de ADN provenientes da 1ª e da 2ª PCR em combinação com os oligonucleotídeos p1 e p4 segundo o método de von Hortome et al. (Gene 77, 61-68, 1989) a uma terceira PCR. O fragmento amplificado de 760 pb foi digerido com as enzimas de restrição NcoI e SaII e foi inserido entre os locais NcoI e SaII do vector pTRC99 utilizando métodos correntes (J. Sambrook et al., 1989 supra). Deste modo integrou-se por clonagem no vector pTRC um gene híbrido que codifica para parte dos antígenos SERP e MSA I. O codão de início faz neste caso parte do antígeno SERP, isto é, esta construção não possui na extremidade N-terminal qualquer fusão com uma sequência específica da malária. O gene fundido codifica no total para pelo menos 4 epítomos de células T.


A fim de verificar se estes genes híbridos provocam realmente a expressão, transformaram-se células competentes de E. coli dh5 com o plasmídeo construído e induziram-se com isopropiltiogalactosido (IPTG) conforme descrito por Amann et al. (1988, supra). Concentraram-se as células induzidas por centrifugação e analisou-se a amostra de proteína por



meio de SDS-PAGE. Coraram-se as proteínas por azul de Coomassie ou transferiram-se para nitrocelulose, a fim de se incubarem com anticorpos contra os antígenos SERP e MSA I. A amostra de proteína mostra que após indução expressa uma proteína de 28 kD com rendimento elevado. Esta proteína é uma proteína híbrida constituída por 135 ácidos aminados do antígeno SERP e 115 ácidos aminados do antígeno MSA I. A proteína reage positivamente na análise de mancha de Western com anti-soros contra o antígeno SERP e contra o antígeno MSA I. A construção plasmídica constituída pelo vector pTRC e pelo gene híbrido foi designado como plasmídeo pTC.

A fim de poder clonar fragmentos de outros antígenos de P. falciparum independentes do seu quadro de leitura, substituiu-se o poliadaptador do vector pTC pelo poliadaptador do vector pTRC99A,B,C (Aman et al., 1988, supra). Para este fim, digeriu-se o vector com HindIII e em seguida preencheu-se o local de restrição HindIII com polimerase de ADN T4 de acordo com métodos conhecidos (J. Shambrook et al., 1989, supra) na extremidade 3' com nucleótidos. Em seguida digeriu-se este vector com ScaI, obtendo-se um fragmento de 830 pb que foi separado do ADN do vector por meio de electroforese em gel. Eluiu-se do gel o ADN do vector. Simultaneamente digeriram-se os vectores pTRC99A,B, e C com NcoI e em seguida preencheram-se as extremidades 5'-reentrantes com polimerase de ADN T4. Após restrição dos três vectores com ScaI obteve-se de cada vez um fragmento de 890 pb que foi isolado do ADN do vector por meio de electroforese em gel. Este fragmento NcoI-ScaI de 890 pb dos vectores pTRC99A,B e C foi integrado por clonagem no resíduo do vector pTC. Desta operação resultaram os plasmídeos pTC1, pTC2 e pTC3, que contém o poliadaptador do vector pTRC nos três quadros de leitura diferente.

Digeriu-se o ADN do plasmídeo PUC-HRPII com as enzimas de restrição BamHI e HindIII. Desta digestão resultou um fragmento de ADN com 610 pb que foi purificado por electroforese em gel. Simultaneamente tratou-se o vector pTC2



com as mesmas enzimas de restrição e desfosforilou-se. Integrou-se por clonagem o fragmento de ADN específico para HRPII de acordo com métodos descritos (J. Sambrook et al., 1989 supra) no vector pTC2. Após transformação de células DH5  $\alpha$  cultivaram-se colónias individuais a 37°C sobre placas de agar LB que continham 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Isolou-se o ADN plasmídico de algumas destas colónias e investigou-se a inserção do fragmento HRPII por restrição com BamHI e HindIII. Cultivaram-se as colónias positivas de um dia para o outro a 37°C e em seguida induziram-se durante duas horas com IPTG 1 mM. Após concentração da suspensão bacteriana por centrifugação analisou-se a amostra de proteína por meio de SDS-PAGE. Nesta análise coraram-se as colónias com azul de Coomassie directamente ou transferiram-se para nitrocelulose e investigaram-se com anticorpos contra os antígenos SERP, MSA I e HRPII. Adicionalmente as bactérias expressaram uma banda proteica de 62 kD que reagiu na análise de mancha de Western com anti-soros contra as três proteínas da malária SERP, MSA I e HRPII. Este antígeno híbrido é triplo e contém 135 ácidos aminados de SERP 115 ácidos aminados do antígeno MSA I e 189 ácidos aminados do antígeno HRPII. Os ácidos aminados desde a posição 251 até a posição 265 foram codificados pela região do adaptador.


#### **Exemplo 4**

##### **Ensaio de protecção segundo o modelo de Aotus**

- a. Componentes isolados de HRPII e 31-1 lrd (fragmento que contém a região MSA I usada)

Escolheram-se aleatoriamente 9 macacos Aotus (peso corporal 1000 a 1500 g, machos e fêmeas do biotério da Behringwerke AG) e separaram-se em três grupos de 3 animais cada um (Grupos A, B e C).

Imunizaram-se todos os três animais do grupo A no decurso de 3 semanas três vezes com 100  $\mu$ g de cada vez de uma proteína de fusão MS2/HRPII (dissolvida em PBS) por via subcutânea. Como adjuvante para o antígeno utilizou-se



uma mistura a 10 % de 50 % de  $Al(OH)_3$  + 45 % de lecitina +  
+ 5 % de saponina.

Os três animais do grupo B foram imunizados segundo o mesmo esquema que a proteína de fusão de MS2 que contém os ácidos aminados 26 a 66 e 106 a 258 de MSA I.

A 3 animais do grupo de comparação da infecção (grupo C) administraram-se sempre segundo o esquema anteriormente referido uma injeção de PBS + adjuvante sem componente antigénico.

**b.** Componentes isolados de SERP

Escolheram-se aleatoriamente 8 macacos Aotus (peso corporal 1000 a 1500 g, machos e fêmeas do biotário da Behringwerke AG) e separaram-se em 2 grupos de 4 animais cada um (Grupos D e E).

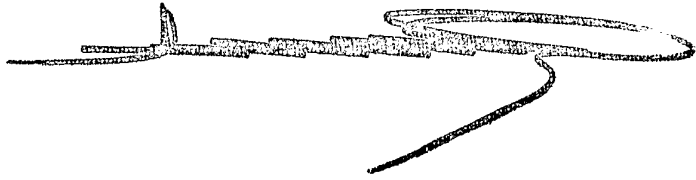
Imunizaram-se todos os 4 animais do grupo D no decurso de 3 semanas três vezes com uma combinação das regiões do antigénio SERP dos ácidos aminados 68 a 184 e dos ácidos aminados 631 a 892, ambos expressos sob a forma de proteínas de fusão com MS2 (100 ug por cada proteína de fusão e dose, dissolvida em PBS com ureia 3M) por via subcutânea. Como adjuvante para o antigénio utilizou-se uma mistura a 10 % de 50 % de  $Al(OH)_3$  + 45 % de saponina.

A 4 animais do grupo de comparação da infecção (grupo E) administraram-se sempre segundo o esquema anteriormente referido uma injeção de PBS + adjuvante sem componente antigénico.

**c.** Proteína híbrida MS2/SERP/HRPII

Escolheram-se aleatoriamente 4 macacos Aotus (peso corporal 1000 a 1500 g, machos e fêmeas do biotário da Behringwerke AG) e separaram-se em 2 grupos de 2 animais cada um (Grupos F e G).

Imunizaram-se os 2 animais do grupo F no decurso de 3 semanas três vezes com 100  $\mu$ g de cada vez da proteína híbrida (dissolvida em PBS/ureia 3 M) por via subcutânea.



Como adjuvante para o antigénio utilizou-se uma mistura 10 % de polialfaolefina.

A 2 animais do grupo de comapração da infecção (grupo G) administrou-se igualmente segundo o esquema anteriormente referido uma injeção de PBS/ureia 3 M + adjuvante sem componente antigénico.

**d.** Proteínas híbridas MS2/SERP/HRPII e SERP/MSAI/HRPII

Escolheram-se aleatoriamente 9 macacos Aotus corporal 1000 a 1500 g, machos e fêmeas do biotério da BehringwerkeAG) e separaram-se em 3 grupos de 3 animais cada um (Grupo A, I e K).

Imunizaram-se todos os três animais do grupo H no decurso de 3 semanas três vezes com 100 ug de cada vez de uma proteína híbrida MS2/SERP/HRPII (dissolvida em PBS/ureia 3 M) por via subcutânea. Como adjuvante para o antigénio utilizou-se uma mistura a 10 % de polialfaolefina. Os três animais do grupo I foram imunizados segundo o mesmo esquema com a proteína híbrida SERP/MSAI/HRPII.

A 3 animais do grupo de comparação da infecção (grupo K) administrou-se igualmente segundo o esquema anteriormente referido uma injeção de PBS/ureia 3 M + adjuvante sem componente antigénio.

Praticou-se esplenectomia a todos os animais dos grupos A a K uma semana após a última imunização e cerca de uma semana mais tarde infectaram-se com  $5 \times 10^6$  (A a G) ou com  $2 \times 10^6$  (H a K) de eritrocitos parasitados in vivo (P. falciparum Patolo Alto).

**Legendas**

Figuras 1 a 4: Experiência de imunização no modelo de Aotus (Exemplo 4)

P. % = % de parasitemia

d = dias após a infecção



t = terapia

In. = inoculação (infecção com *P. falciparum*, carga da inoculação)

Fig. 1: Inoculação com componentes isolados HRPII (grupo A) e MSA I (grupo B); branco = grupo C

Fig. 2: Inoculação com componentes isolados SERP (grupo D); branco = grupo E

Fig. 3: Inoculação com proteína híbrida MS2/SERP/HRPII (grupo F); branco = grupo G

Fig. 4: Inoculação com proteínas híbridas MS2/SERP/HRPII (Grupo H) e SERP/MSAI/HRPII (grupo I); branco = grupo K

Fig. 5:

- 1) descreve esquematicamente a construção a partir de MS2, SERP e HRPII (plasmídeo pEX SERP/HRP II), tendo-se integrado um adaptador de 2 ácidos aminados entre SERP e HRPII.
- 2) Descreve esquematicamente o plasmídeo correspondente pTC2 HRP II

aa = ácidos aminados

= R E I V I N D I C A Ç Õ E S =

- 1ª -

Processo para a preparação de uma proteína híbrida de *Plasmodium falciparum* que contém pelo menos dois epítomos SERP de células T bem como uma sequência parcial de HRPII caracterizado por se expressar num sistema de expressão adequada a sequência que codifica para a referida proteína híbrida e se isolar o produto de expressão resultante.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a proteína híbrida obtida conter o domínio desde o ácido aminado 630 até ao ácido aminado 892 de SERP e os 189 ácidos aminados C-terminais de HRPII.

- 3ª -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 caracterizado por se incorporar adicionalmente na proteína híbrida obtida uma fracção MSAI com pelo menos 2 epítomos de células T.

- 4ª -

Processo para a preparação de uma vacina caracterizado por se incorporar uma proteína híbrida preparada de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3.


- 5ª -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por se incorporar adicionalmente um adjuvante apropriado.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 14 de Dezembro de 1990, sob o número de série P 40 41 836.7.

Lisboa, 23 de Dezembro de 1991  
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



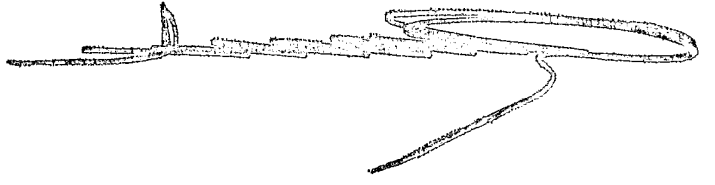
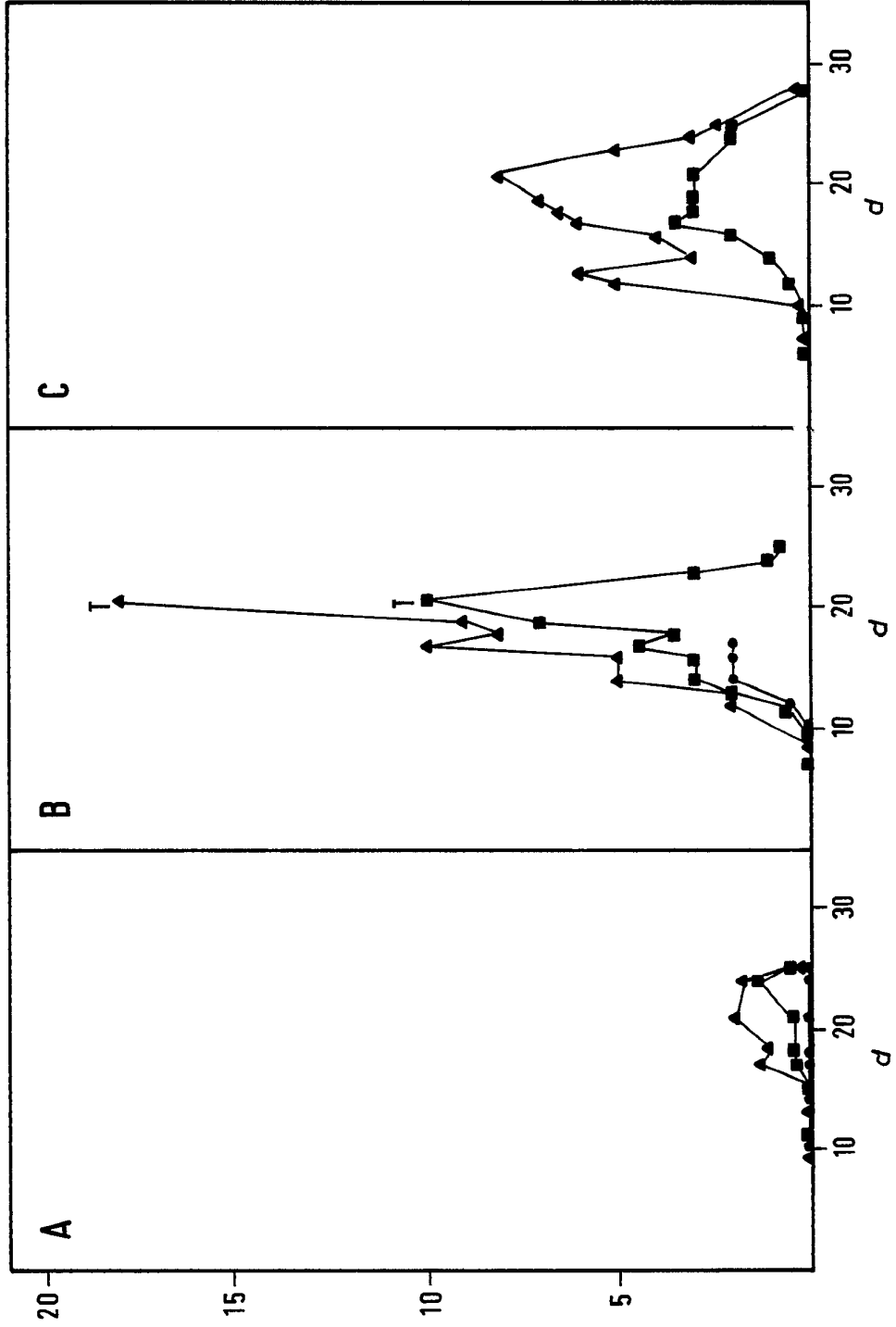


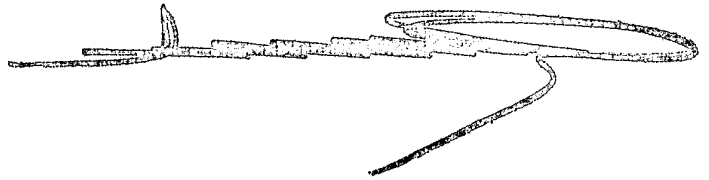
= R E S U M O =

"PROCESSO PARA A PROTECÇÃO DE PROTEÍNAS HÍBRIDAS DE PLASMODIUM FALCIPARUM QUE CONTÊM SEQUÊNCIAS DOS ANTIGÉNIOS DA MALÁRIA HRPII E SERP E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE CONTÊM ESTAS PROTEÍNAS"

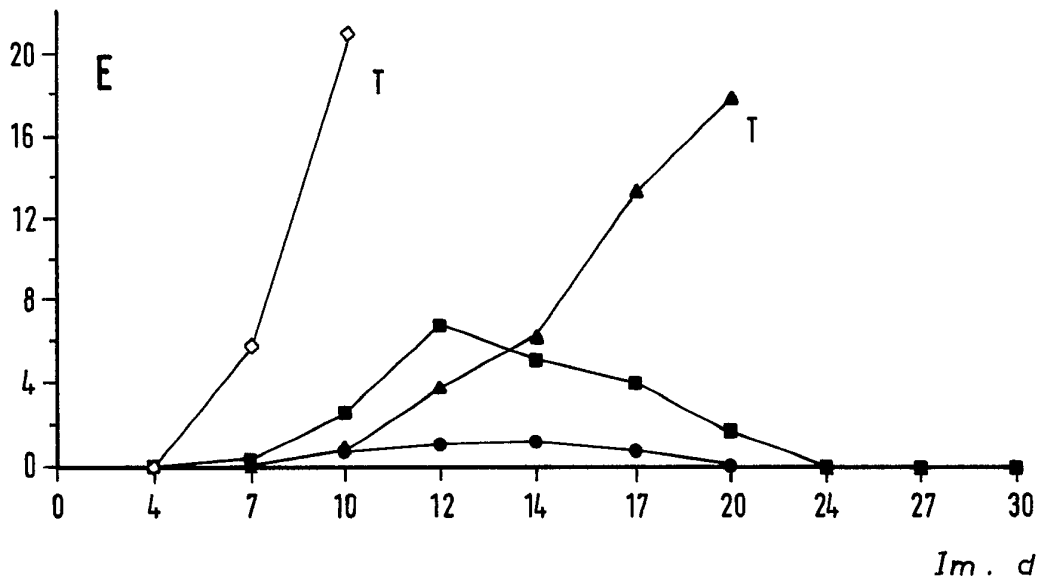
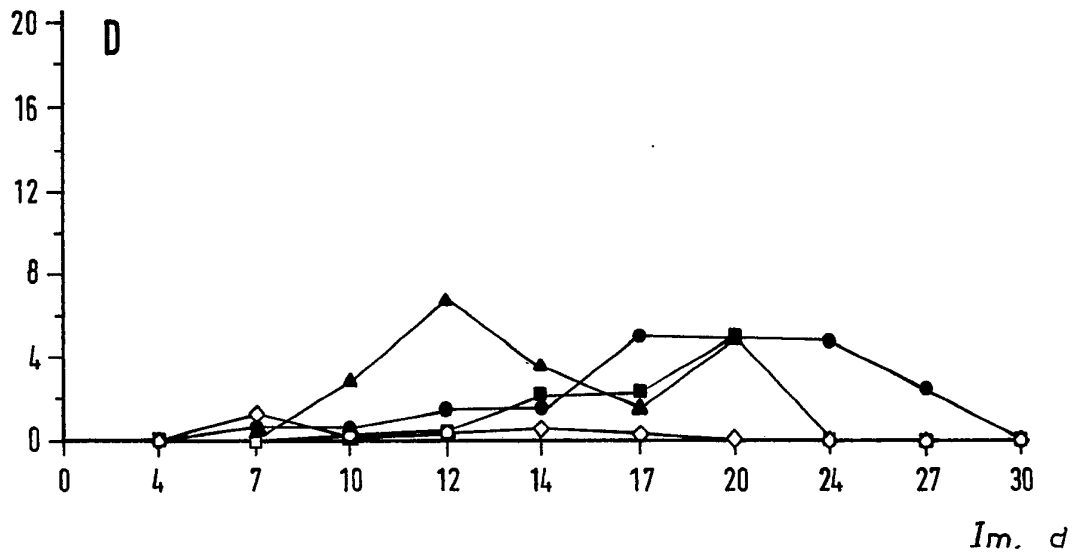
A invenção refere-se aum processo para a preparação de uma proteína híbrida de Plasmodium falciparum que contém pelo menos dois epítqpos SERP de células T bem como uma sequência parcial de HRPII que compreende expressar-se num sistema de expressão adequado a sequência que codifica para a referida proteína híbrida e isolar-se o produto de expressão re\_sultante.

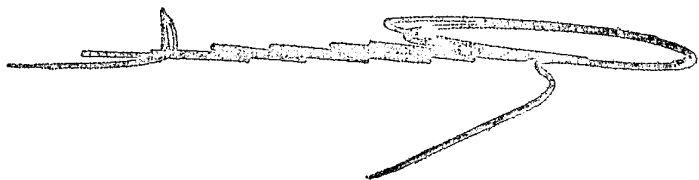
**Fig. 1**



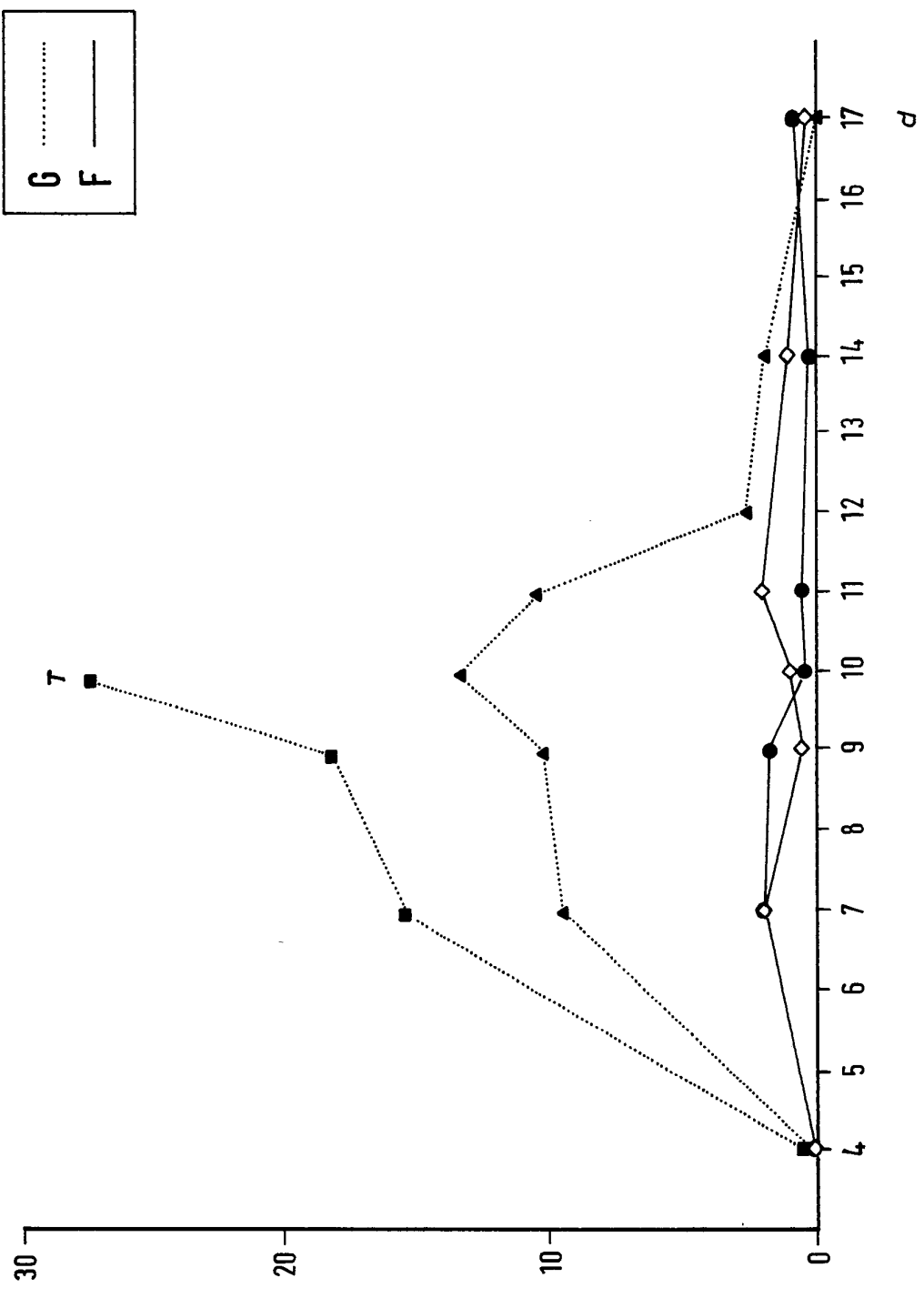


**Fig. 2**

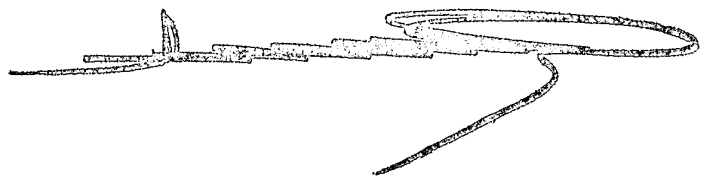
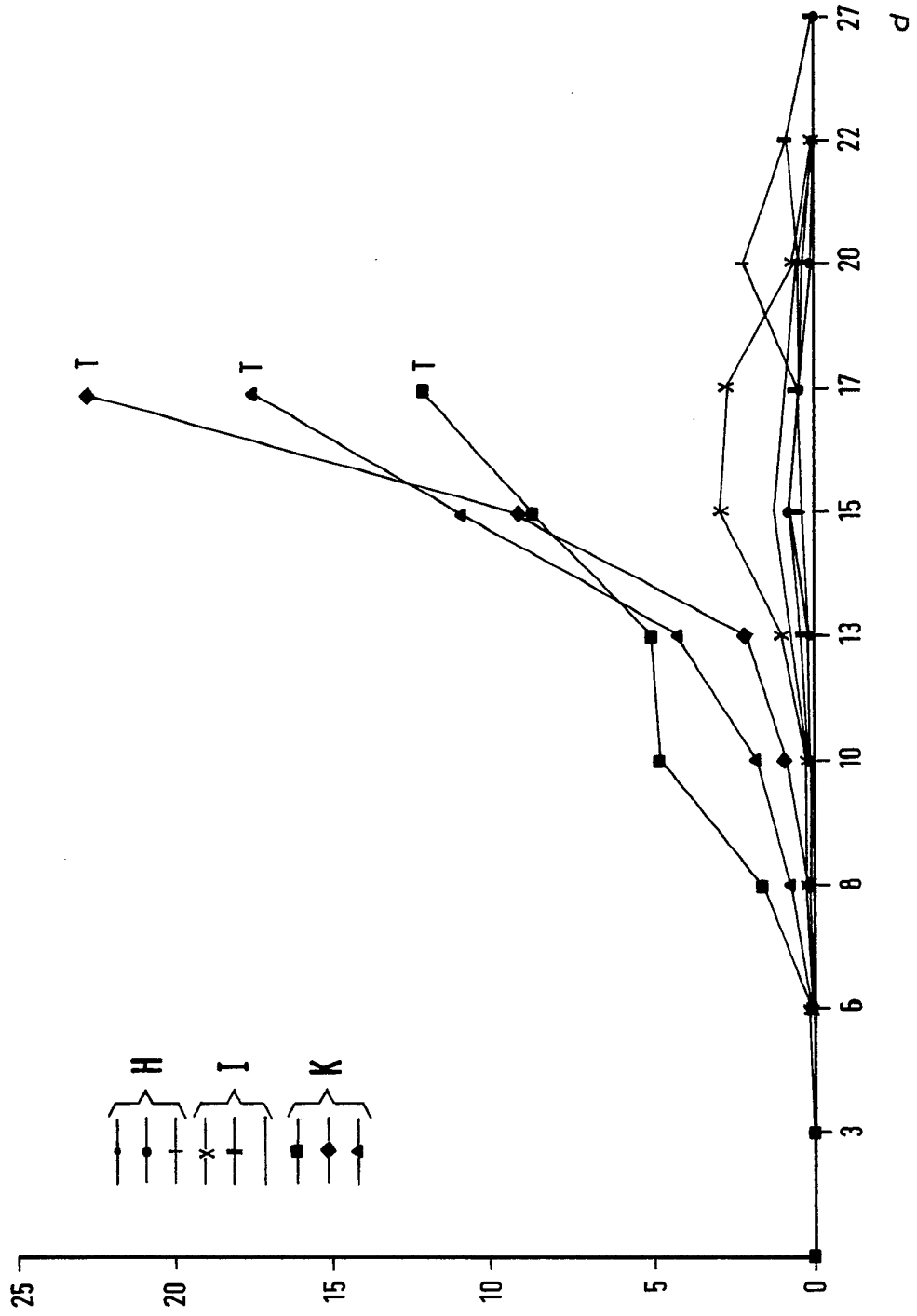




**Fig. 3**



**Fig. 4**



# Fig. 5

