



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90490 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C07C245/06 A	C07C265/08 B
C07C309/24 B	C07C327/38 B
C07C331/16 B	G01N033/68 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.05.08	(73) <i>Titular(es):</i> CIBA-GEIGY AG. KLYBECKSTRASSE 141 4002 BALE CH
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.05.10 CH 1766/88 1989.03.22 CH 1065/89	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1989.11.30	(72) <i>Inventor(es):</i> JUI YOA CHANG CH
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 02/94 1994.02.03	(74) <i>Mandatário(s):</i> JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ RUA DE VÍTOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS AROMATICOS E DO DISPOSITIVO QUE OS UTILIZA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

42

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 90 490

REQUERENTE: CIBA-GEIGY AG., suíça, com sede em Klybeck
strasse 141, 4002 Basel, Suíça.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS ARO
MATICOS E DO DISPOSITIVO QUE OS UTILIZA".

INVENTORES: Jui Yoa Chang.

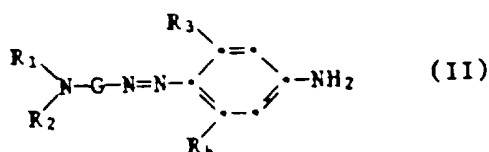
Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Suíça, em 10 de Maio de 1988 sob o n.º..
1766/88-3 e em 22 de Março de 1989 sob o n.º. 1065/89-2 .

em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno, eventualmente substituído, ou um grupo 1,4-neftileno, eventualmente substituído, e em que R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 representa halogenometilo e L representa um átomo de oxigénio, e dos sais destes ácidos. O presente invento diz também respeito a um processo para a preparação de compostos de partida e dos seus sais, usados na preparação dos compostos de fórmula (I) e a um processo para o fabrico de um dispositivo no qual se podem utilizar os compostos de fórmula I e os seus sais, e a um processo segundo o qual se pode utilizar o referido dispositivo.

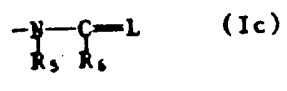
Os compostos de fórmula I podem ser utilizados como agentes auxiliares para a investigação de proteínas.

O processo para a preparação de compostos de fórmula (I) consiste, por exemplo, em, num composto de fórmula (II):

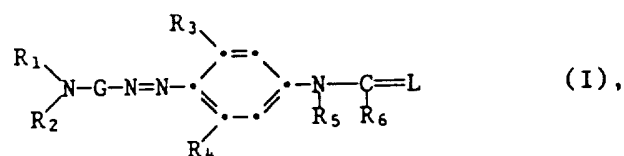


ou num seu sal, se converter o grupo NH_2 num grupo de fórmula (Ic)

 -3-



O presente invento refere-se a um processo para a preparação de novos ácidos aromáticos, nomeadamente compostos de fórmula



em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno, eventualmente substituído, ou um grupo 1,4-naftileno, eventualmente substituído, e em que R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L significa um átomo de oxigénio ou de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 representa halogenometilo e L representa um átomo de oxigénio, e se refere aos seus sais, e se refere à utilização dos compostos de fórmula I e dos seus sais, a um processo para a preparação de compostos de partida e dos seus sais, para a obtenção dos compostos de fórmula I e dos seus sais, e se refere ainda a um processo para a preparação de um dispositivo apropriado para a utilização dos compostos de fórmula I e dos seus sais, e se refere a um processo no âmbito do qual o referido dispositivo pode ser utilizado.

Grupos 1,4-fenileno, eventualmente substituídos, são, por ex., grupos 1,4-fenileno, eventualmente substituídos por carboxi e/ou sulfo, em que os grupos 1,4-fenileno substituídos poderão conter um número máximo de 4,

em especial 1 ou 2, dos referidos substituintes. Caso os grupos 1,4-fenilo substituídos apresentem mais de um substituinte, então vários ou todos destes substituintes poderão ser idênticos. Mencionem-se, a título de exemplo, o grupo 2-sulfo, 2,3-, 2,5- e 3,5-dissulfo-2,3,5-trissulfo- e 2,3,5,6-tetrassulfo-1,4-fenileno, o grupo 2-carboxi-, 2,3-, 2,5- e 3,5-dicarboxi-, 2,3,5-tricarboxi- e 2,3,5,6-tetracarboxi-1,4-fenileno, o grupo 2-carboxi-3-sulfo-, 2-carboxi-5-sulfo-, 3-carboxi-5-sulfo-, 2,3-dicarboxi-5-sulfo-, 3,5-dicarboxi-2-sulfo-, 5-carboxi-2,3-dissulfo- e 2-carboxi-3,5-dissulfo-1,4-fenileno e, em especial, o grupo 1,4-fenileno.

Grupos 1,4-naftileno, eventualmente substituídos, são, por ex., grupos de 1,4-naftileno, eventualmente substituídos por carboxi e/ou sulfo, em que os grupos 1,4-naftileno substituídos podem conter um número máximo de 1 a 6, em especial, 1 a 3, dos referidos substituintes. Caso os grupos 1,4-naftileno substituídos apresentem mais de um substituinte, então vários ou todos esses substituintes podem ser idênticos. Podemos indicar, a título de exemplo, o grupo 2-, 5- e 6-sulfo-, 2,3-, 5,6-, 6,7- e 2,6-dissulfo-, 2,3,5- e 2,3,6-trissulfo- e 2,3,5,7- e 2,3,6,7-tetrasulfo-1,4-naftileno, o grupo 2-, 5- e 6-carboxi, 2,3-, 5,6-, 6,7- e 2,6-dicarboxi-, 2,3,5- e 2,3,6-tricarboxi- e 2,3,5,7- e 2,3,6,7-tetracarboxi-1,4-naftileno, o grupo 2-carboxi-3-sulfo-, 2-carboxi-5-sulfo-, 3-carboxi-6-sulfo-, 5-carboxi-7-sulfo-, 2,3-dicarboxi-5-sulfo-, 3,5-dicarboxi-2-sulfo-, 6,7-dicarboxi-2-sulfo-3-carboxi-6,7-dissulfo-, 5-carboxi-2,3-dissulfo- e 2-carboxi-3,5-dissulfo-1,4-naftileno e, em especial, o grupo 1,4-naftileno.

O presente invento refere-se, por ex., à preparação de compostos de fórmula I, em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno, eventualmente substituído, ou um grupo 1,4-naftileno, eventualmente substi-



tuido, R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L significa um átomo de oxigênio ou de enxofre, e se refere aos seus sais.

Os compostos de fórmula I podem estar presentes, em parte, sob a forma de estereoisômeros. Se, por ex., os compostos de fórmula I apresentarem pelo menos um átomo de carbono quiral (átomo C^*) por ex., um átomo C^* de um correspondente radical R_1), eles poderão estar presentes, por ex., como enantiômeros ou misturas enantiômeras, tal como sob a forma de racematos, e, caso ainda esteja presente, pelo menos, mais um centro assimétrico (por ex., um átomo de C de um correspondente radical R_2), eles podem também estar presentes sob a forma de diastereômeros, misturas diastereômeras ou misturas de racematos.

Sais de compostos de fórmula I são em especial sais com bases, de preferência, sais com bases, farmacêuticamente aceitáveis, por ex., sais de metais alcalinos ou de metais alcalino-terrosos, por ex., sais de sódio, potássio ou magnésio, sais de metais de transição, tais como os sais de zinco ou de cobre, ou sais com amônia ou aminas orgânicas, tais como aminas cíclicas, tais como mono-, di- ou tri-alquilo inferior-aminas, como hidroxialquilo inferior-aminas, por ex., mono-, di- ou tri-hidroxialquilo inferior-aminas, hidroxialquilo inferior-alquilo inferior-aminas ou polihidroxialquilo inferior-aminas.

Aminas cíclicas são, por ex., morfina, tiomorfina, piperidina ou pirrolidina. Mono-alquilo inferior-aminas são, por ex., etil- ou t-butil-amina; dialquilo inferior-aminas são, por ex., dietil- ou diisopropil-amina; trialquilo inferior-aminas são, por ex., trimetil- ou trietil-amina.

Hidroxialquilo inferior-aminas correspondentes são, por ex., mono-, di- ou tri-etanolamina, e

hidroxi-alquilo inferior-alquilo inferior-aminas, são, por ex. N,N-dimetil-amino- ou N,N-dietilamino-etanol, enquanto polihidroxi-alquilo inferior-aminas são, por ex., glucosamina. Os compostos de fórmula I podem também formar sais de adição de ácidos, de preferência sais de adição de ácidos, farmacêuticamente aceitáveis, por ex., com ácidos inorgânicos fortes, tais como ácidos minerais, por ex., ácido sulfúrico, com um ácido fosfórico ou um ácido halídrico, com fortes ácidos carboxílicos orgânicos, tais como ácidos carboxílicos de alcanos inferiores, por ex., ácido acético, tal como ácidos dicarboxílicos, eventualmente insaturados, por ex., ácido malônico, ácido maleico ou ácido fumárico, ou com ácidos hidroxi-carboxílicos, por ex., ácido tartárico ou ácido cítrico, ou com ácidos sulfônicos, tais como ácidos sulfônicos de alcanos inferiores ou ácidos benzenossulfônicos, eventualmente substituídos, por ex. ácido metano- ou ácido p-tolueno-sulfônico. Os compostos de fórmula I podem também formar sais internos. O presente invento refere-se também à preparação de sais de compostos I, menos apropriados para fins farmacêuticos. Estes sais podem ser utilizados, por ex., para o isolamento ou a purificação de compostos de fórmula I, livres, do presente invento, bem como dos seus sais, farmacêuticamente aceitáveis.

Na presente memória descritiva, o termo "inferior" utilizado em relação com os radicais ou compostos do invento, significa - a não ser que haja qualquer menção em contrário - os radicais ou compostos que contêm um número máximo de 7 átomos de carbono, em especial, um número máximo de 4 átomos de carbono.

Alquilo inferior representa, por ex., C₁-C₄-alquilo, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo ou terc.-butilo e abrange ainda radicais de C₅-C₇-alquilo, isto é, radicais pentilo, hexilo ou heptilo.

Halogenometilo representa flúoro-, cloro- ou bromo-metilo, e em especial, representa iodometilo.

Os compostos de fórmula I e seus sais possuem valiosas propriedades. Assim, por ex., eles podem ser utilizados como agentes auxiliares na análise de proteínas por ex., como reagentes para a modificação química de proteínas. O conceito de "proteínas" abrange na presente memória descritiva tanto péptidos com uma massa molar relativa de 10.000 ou mais, que, geralmente, se designam por proteínas, como também encerra os péptidos com uma massa molar relativa inferior a 10.000, que geralmente, se designam por poli-péptidos, o limite inferior para a massa molar relativa dos polipéptidos varia entre cerca de 1000 e cerca de 2000. Do grande número das aplicações, em que a modificação química de proteínas poderá desempenhar um papel importante, poderemos mencionar a determinação da estrutura e a coloração de proteínas.

Sabe-se que a simples modificação de um único constituinte amino-ácido de uma proteína, ou de alguns poucos dos seus constituintes amino-ácidos, é capaz de alterar significativamente a estrutura espacial de uma proteína e, desta maneira, também a sua função, por ex., a sua actividade biológica. Desta forma, existe a possibilidade de aproveitar a modificação química específica dos amino-ácidos constituintes como um processo largamente aplicável para a determinação da contribuição destes constituintes estruturais para a estrutura espacial de uma proteína. Põe-se assim, o problema de relacionar a alteração, eventualmente verificada, em virtude de uma determinada modificação química de amino-ácidos constituintes com o tipo e a extensão desta modificação química. Para isso, é necessário determinar a estrutura de uma proteína modificada quimicamente e compará-la com a estrutura existente antes da modificação química. Uma das finalidades de uma determinação estrutural deste género consiste em verificar como é que a estrutura primária da proteína se alterou pela modificação química, isto é, quais foram os amino-ácidos constituintes

tes que sofreram uma modificação química. Frequentemente, nestas determinações da estrutura primária proteica procede-se de forma a tratar uma proteína M_a , modificada quimicamente, que se obtém a seguir à modificação química de uma correspondente proteína não-modificada N_a , e a proteína N_a não-modificada, eventualmente após realização de uma etapa de desnaturação, eventualmente necessária com a mesma protease, em seguida, as misturas peptídicas assim obtidas M_a^1 e N_a^1 são submetidas à cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC), comparando-se os padrões dos picos nos dois cromatogramas resultantes M_a^2 e N_a^2 . Utilizam-se, neste caso, geralmente sistemas de detecção para a obtenção destes cromatogramas, que analisam o comportamento em termos da absorção da luz dos péptidos. Geralmente, o padrão dos picos no cromatograma M_a^2 distingue-se naquelas zonas em que são detectados péptidos M_a^3 , que pelo menos contêm um amino-ácido modificado quimicamente, do padrão dos picos no cromatograma N_a^2 , dado que os péptidos M_a^3 , por via de regra, apresentam um comportamento em termos de absorção da luz diferente daquele dos correspondentes péptidos N_a^3 não-modificados. Separam-se os péptidos M_a^3 e submetem-se estes péptidos a uma análise ulterior da sua estrutura primária, por ex., a análise da sequência dos aminoácidos. Num caso ideal, é possível identificar e caracterizar, desta maneira, qualquer amino-ácido constituinte, quimicamente modificado.

No entanto, o processo atrás referido apresenta ainda muitos defeitos. Assim, por ex., acontece que no caso de uma massa molecular relativa mais elevada da proteína em análise, geralmente, após tratamento com a protease, existem na correspondente mistura peptídica muitos péptidos diferentes, cuja presença não permite realizar uma separação adequada, por HPLC, desta mistura peptídica. Além disso, a própria modificação química é muitas vezes demasiado complexa, decorre, frequentemente, de forma não-específica, incide portanto sobre muitos constituintes amino-ácidos de estrutura diferente, ou até em todos os amino-ácidos da proteína em análise. Com vantagem, a modificação química deveria decorrer de

forma bastante específica, isto é, abranger uma classe circunscrita de amino-ácidos, com vantagem, uma classe estreitamente definida em termos de tipo e número, de constituintes amino-ácidos da proteína em questão.

Assim, é conveniente que o processo atrás descrito seja aperfeiçoado, eliminando as referidas desvantagens, o que se reveste de grande interesse prático. Os compostos de fórmula I e os seus sais, revelados no âmbito do presente invento, tornam possível a desejada otimização deste processo. O aperfeiçoamento/optimização será seguidamente esclarecido com base nos compostos de fórmula I, em que R_1 a R_4 e G têm os referidos significados, R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre, e nos seus sais. Estes compostos serão designados, seguidamente, por compostos de fórmula IA.

Na modificação química de uma proteína, isto é, durante a reacção com esta proteína, os compostos IA e os seus sais reagem, em primeiro lugar, e de forma praticamente exclusiva, com os grupos amino na posição e de radicais lisina (elemento estrutural lisina), observando-se uma elevada reactividade. Apenas em casos isolados é que se verifica primeiro uma reacção com o grupo amino do radical aminoácido N-terminal da respectiva proteína. Assim, os radicais amino-ácidos de uma proteína, que sofram a modificação química por um composto de fórmula IA ou por um dos seus sais, encontram-se estreitamente delimitados, quanto ao género e número, de maneira inequívoca e vantajosa. Assim, o número dos elementos estruturais aminoácidos, quimicamente modificados, não é geralmente superior ao número dos radicais lisina presentes na proteína em análise. Apenas num caso especial, aquando de uma modificação N-terminal adicional, este número poderá ainda ser maior pela unidade 1.

Além disso, a utilização de um composto de fórmula IA ou de um dos seus sais para a modificação

química de uma proteína apresenta a vantagem de que, após o tratamento por proteases, da proteína M_b resultante, quimicamente modificada, se obtém uma mistura peptídica M_b^1 , a qual, mediante simples cromatografia líquida em fase invertida, de elevada poder de resolução (reversed phase HPLC) é susceptível de separação, geralmente completa, dos péptidos M_b^3 (contendo, pelo menos um aminoácido constituinte, quimicamente modificado) dos restantes péptidos N_b^3 .

Além disso, os péptidos M_b^3 , por um lado, contidos na mistura peptídica M_b^1 , contendo pelo menos um amino-ácido constituinte, quimicamente modificado, e os péptidos N_b^3 não-modificados, por outro lado, podem ser detectados, respectivamente, a diferentes comprimentos de onda, dado que os péptidos M_b^3 apresentam um comportamento em termos de absorção da luz que se distingue nitidamente do observado no caso dos péptidos N_b^3 . Esta circunstância facilita muito a identificação dos péptidos M_b^3 .

Assim, os péptidos M_b^3 , sendo coloridos, podem ser detectados, com vantagem, a comprimentos de onda da luz visível, por ex., a comprimentos de onda de 400 a cerca de 800 nm, em solução ácida, por ex., de 535 nm, ou, em solução alcalina, a um comprimento de onda de 465 nm, de preferência, a um comprimento de onda indicado nos exemplos práticos 10 a 15.

Em contrapartida, os péptidos incolores N_b^3 podem ser visualizados a um comprimento de onda de 200, 220 ou 280 nm, não interferindo com a detecção dos péptidos de cor M_b^3 .

Acrescentemos que se reveste de especial interesse o facto de não apenas serem coloridos os péptidos M_b^3 , mas também a correspondente proteína M_b , quimicamente modificada, a partir da qual se formam os péptidos M_b^3 após tratamento por proteases. Dado que a modificação química de

uma proteína por um composto de fórmula IA ou um dos seus sais, sempre acompanhada por uma coloração da respectiva proteína, os compostos de fórmula IA e os seus sais podem também ser utilizados como reagentes para a coloração de proteínas. As proteínas M_b coloridas, obtidas através da reacção de grupos ξ -amino de radicais de lisina, bem como, nalguns casos, através da reacção adicional do grupo amino do radical amino-ácido N-terminal, de correspondentes proteínas N_b não-modificadas, incolores, com um composto de fórmula IA ou um dos seus sais, podem ser utilizadas, de várias maneiras, para fins analíticos e/ou diagnósticos. A separação e detecção das proteínas M_b coloridas, e as indicações correspondentes, atrás mencionadas relativamente à separação e detecção de péptidos de cor M_b^3 , são equivalentes. Também os péptidos M_b^3 podem ser frequentemente utilizados para fins analíticos e/ou diagnósticos.

Visto que as análises de proteínas se realizam, geralmente, em solução aquosa ou em soluções contendo água, segue-se que a boa hidrossolubilidade inerte aos compostos IA e seus sais constitui mais uma propriedade valiosa destes compostos.

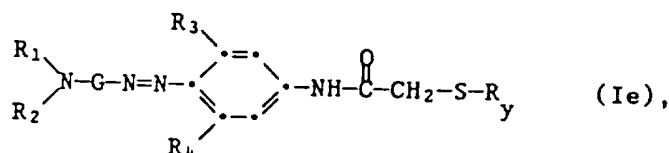
Dado que também as proteínas M_b , quimicamente modificadas, e os péptidos M_b^3 , que contêm pelo menos um radical amino-ácidos quimicamente modificado, se distinguem por uma óptima solubilidade na água, torna-se possível realizar a reacção de proteínas N_b com um composto IA ou um dos seus sais, também outras etapas de processo adicionais, eventualmente previstas, e usuais aquando da análise de proteínas, por ex., aquelas do género mencionado adiante, em solução aquosa, eventualmente com adição de um dissolvente orgânico.

No âmbito da reacção com um composto de fórmula IA ou um dos seus sais, os correspondentes grupos amino de uma proteína N_b , de fórmula geral H_2N-R_x (Ia), em que R_x representa o radical da proteína, isto é, os grupos

etapas reaccionais. Pormenores específicos relativamente às referidas etapas reaccionais constam igualmente dos exemplos práticos 9 a 15. Quanto à estabilidade dos grupos de carbamoílo ou de tiocarbamoílo, nos péptidos M_b^3 , são aplicáveis as afirmações feitas em relação às proteínas Ib.

Para a optimização, atrás mencionada, do processo para a modificação química de proteínas e para a determinação da estrutura primária destas proteínas, quimicamente modificadas, podem utilizar-se, para além dos compostos de fórmula IA e de seus sais, também compostos de fórmula I, em que R_1 a R_4 , e G têm os referidos significados, R_5 representa hidrogénio, R_6 representa halogenometilo e L representa um átomo de oxigénio, e os seus sais. Estes compostos serão designados, seguidamente, por compostos de fórmula IB.

As afirmações feitas em relação aos compostos de fórmula IA e seus sais, são também aplicáveis, de forma análoga, aos compostos de fórmula IB e seus sais. No entanto, os compostos IB e os seus sais, aquando da modificação química de uma proteína, isto é, na reacção com esta proteína, não reagem nem com os grupos ϵ -amino de radicais de lisina, nem com o grupo amino do radical amino-ácido N-terminal da respectiva proteína. Pelo contrário, durante a reacção com um composto de fórmula IB ou com um dos seus sais, acontece especificamente de que os grupos mercapto de radicais cisteína contidos numa proteína N_c , de fórmula geral $HS-R_y$ (Id), em que R_y , em cada caso, representa o radical da proteína, são convertidos em grupos carbonilmetiltio, de modo a obter uma proteína, quimicamente modificada, de fórmula



em que R_1 a R_4 , R_y e G são tal como atrás definidos. Assim, quando se utilizam compostos IB e os seus sais, geralmente a natureza e o número dos elementos estruturais amino-ácidos, que sofrem uma modificação química, são também definidos de maneira inequívoca e, com vantagem, definidos de forma restrita; o número de amino-ácidos constituintes, químicamente modificados, não é superior ao número de resíduo de cisteína contidos na proteína em análise.

Assim, o presente invento refere-se também à utilização de compostos de fórmula I e dos seus sais, como agentes auxiliares na análise de proteínas, por ex., como reagentes para a modificação química de proteínas, em especial como reagentes para a modificação química de proteínas, associada com um processo de coloração. Poderá também estar abrangida a formulação industrial dos agentes auxiliares.

O invento refere-se também a um processo correspondente para a modificação química de proteínas, em especial a um processo para a modificação química de proteínas, associada com uma coloração, processo esse que se caracteriza pela reacção da respectiva proteína com um composto de fórmula I ou com um dos seus sais.

O presente invento refere-se em especial à preparação de compostos de fórmula I, e dos seus sais, em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo, ou um grupo 1,4-naftileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo, e em que R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 representa halometilo e L significa um átomo de oxigénio.

O presente invento refere-se em especial à preparação de compostos de fórmula I e dos seus sais, em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 significa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo, ou um grupo 1,4-naftileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo, R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre.

Mais especialmente, o presente invento refere-se à preparação de compostos de fórmula I e dos seus sais, em que R_1 representa C_1 - C_4 -alquilo, tal como metilo ou etilo, R_2 representa C_1 - C_4 -alquilo, tal como metilo ou etilo, R_3 representa hidrogénio ou sulfo, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por sulfo, e em que R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 representa iodometilo e L representa um átomo de oxigénio.

O presente invento refere-se especialmente à preparação de compostos de fórmula I e os seus sais, em que R_1 representa C_1 - C_4 -alquilo, tal como metilo ou

etilo, R_2 representa C_1-C_4 -alquilo, tal como metilo ou etilo, R_3 representa hidrogénio ou sulfo, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por sulfo, R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre.

O presente invento refere-se especialmente à preparação de compostos de fórmula I e dos seus sais, em que R_1 representa C_1-C_4 -alquilo, tal como metilo, R_2 representa C_1-C_4 -alquilo, tal como metilo, R_3 representa hidrogénio, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído, e em que R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 representa iodometilo e L representa um átomo de oxigénio.

O presente invento refere-se mais especialmente à preparação de compostos de fórmula I, e dos seus sais, em que R_1 representa C_1-C_4 -alquilo, tal como metilo, R_2 representa C_1-C_4 -alquilo, tal como metilo, R_3 representa hidrogénio, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído, R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de enxofre.

O presente invento refere-se especificamente à preparação dos novos compostos de fórmula I, referidos nos exemplos práticos, e dos seus sais.

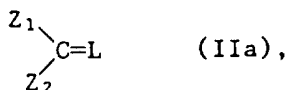
O processo de acordo com o presente invento, para a preparação de um composto de fórmula I ou um dos seus sais, caracterizado, por ex., pelo facto de num composto de fórmula

luente inerte apropriado ou de uma mistura correspondente, geralmente, as reacções realizam-se, conforme as condicionantes, sob arrefecimento, à temperatura ambiente ou sob aquecimento, por ex., numa gama de temperaturas compreendida entre cerca de -80°C e o ponto de ebulição do meio reaccional, de preferência entre cerca de -20°C e cerca de $+150^{\circ}\text{C}$ e, se for necessário, num reactor fechado, sob pressão, numa atmosfera de um gás inerte e/ou em condições anidras.

São conhecidos ou podem ser preparados segundo processos conhecidos per se, alguns dos componentes de partida de fórmulas II, IIa, III, IV, IVa e V, atrás referidos e a mencionar mais adiante, e que são utilizados para a preparação de compostos de fórmula I ou dos seus sais.

Os compostos de partida contendo centros básicos poderão estar presentes sob a forma de sais de ácidos, por ex., com os ácidos atrás mencionados, ao passo que os compostos contendo grupos acídicos podem formar sais com bases, por ex., do género atrás referido.

A transformação do grupo amino (NH_2) presente num composto de fórmula II ou num dos seus sais, num grupo de fórmula Ic, pode realizar-se, por ex., fazendo reagir o composto de fórmula II ou um dos seus sais com um composto de fórmula



em que L representa um átomo de oxigênio ou de enxofre e Z_1 e Z_2 , quer independentemente um do outro, representam um grupo nucleofóbico de partida G_1 ou, em conjunto, representam oxo livre ou modificado na sua função, G_2 , ou em que L representa um átomo de oxigênio, Z_1 representa um grupo nucleofóbico de partida G_1 e Z_2 representa halometilo.

Grupos G_1 nucleofóbicos de saída são por ex., grupos mercapto ou hidroxilivres, esterificados ou esterificados, e ainda grupos amino, amônio ou sulfônio. Hidroxilivres esterificados representam, por ex., alcoxi inferior, tal como metoxi ou etoxi, ou fenilo-alcoxi inferior insubstituído ou substituído, tal como benziloxi, insubstituído ou substituído. Hidroxilivres esterificados representam sobretudo hidroxilivres esterificados por um ácido mineral ou um ácido sulfônico orgânico, em especial halogênio, tal como cloro, bromo ou iodo, sulfoniloxi, tal como alcano inferior-sulfoniloxi insubstituído ou halosubstituído, por ex., metanossulfoniloxi, ou trifluorometano-sulfoniloxi, ciclo-alcano-sulfoniloxi, por ex., ciclohexano-sulfoniloxi, ou benzenossulfoniloxi insubstituído ou substituído por alquilo inferior ou halo, por ex., benzenossulfoniloxi, *p*-bromofenilsulfoniloxi ou *p*-toluenossulfoniloxi, e ainda alcanoloxi inferior, por ex., acetoxi ou pivalóxi. Mercapto esterificados representam, por ex., alquilo inferior-tio, tal como metiltio ou etiltio, ou feniltio insubstituído ou substituído, tal como feniltio ou *p*-toliltio. Grupos mercapto esterificados são, por ex., grupos alcanoiltio inferior, tal como acetiltio. Grupos amino são, por ex., amino, N-alquilo inferior-amino, N,N-dialquilo inferior-amino ou N-alcanoiltio inferior-amino, e também grupos N,N-alcileno inferior-amino ou N,N-aza-, N,N-oxa- ou N,N-tia-alcileno inferior-amino, por ex., dimetilamino ou dietilamino, e também pirrolidino, piperidino, morfolino ou tiomorfolino, e ainda anilino. Grupos amônio são, por ex., grupos amônio terciários ou quaternários, correspondentes aos grupos amino atrás referidos, tal como trialquilo inferior-amônio ou piridino. Grupos sulfônio são, por ex., grupos dialquilo inferior-sulfônio, tal como

dimetilsulfônio.

Oxo G_2 , livre ou modificado na sua função, representa, por ex. oxo, tioxo ou um grupo $=N-R'$. Grupos $=N-R'$ são, por ex., aqueles grupos, em que R' representa hidrogênio, alquilo inferior ou um radical acilo, tal como alcanóilo inferior, benzóilo insubstituído ou substituído, piridóilo ou alcano inferior-sulfonilo, por ex., imino, N-alquilo inferior-imino, N-alcanóilo inferior-imino, N-benzóilimino insubstituído ou substituído, ou grupos N-alcano inferior sulfonilimino.

Compostos de fórmula IIa que se utilizam, de preferência, para a preparação de compostos de fórmula I, em que R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional, ou os seus sais, são, por ex., tiofosfênio ($Z_1 = Z_2 = \text{cloro}$) e dissulfureto de carbono (Z_1 e $Z_2 = \text{tioxo}$), que dão origem à formação de compostos de fórmula I, em que L representa um átomo de enxofre, ou dos seus sais, e ainda fosfênio ($Z_1 = Z_2 = \text{cloro}$), que dá origem à formação de compostos de fórmula I em que L representa um átomo de oxigênio, ou dos seus sais.

Compostos de fórmula IIa, que se usam de preferência para a preparação de compostos de fórmula I, em que R_5 representa hidrogênio e R_6 representa halometilo, ou dos seus sais, são, por ex., ácidos haloacéticos ($Z_1 = \text{hidroxi}$; $Z_2 = \text{halometilo}$; $L = \text{oxigênio}$) e os correspondentes derivados de ácidos haloacéticos reactivos (Z_1 , por = halogênio, alcoxi inferior ou sulfoniloxi).

A reacção de um composto de fórmula II ou de um dos seus sais com um composto de fórmula IIa realiza-se de maneira usual, por ex., na presença eventual de um agente de condensação, tal como uma base apropriada, e, no caso da reacção com compostos de fórmula IIa, em que Z_1 e Z_2 ,

em conjunto, representam tioxo, eventualmente na presença de um agente capaz de se combinar com enxofre e, no caso da reacção com compostos de fórmula IIa, em que Z_1 representa G_1 , Z_2 representa halometilo e L representa um átomo de oxigénio, eventualmente na presença de um agente desidratante, na ausência ou, geralmente, na presença de um solvente ou diluente inerte, apropriado, ou numa mistura correspondente e, segundo as necessidades, sob arrefecimento, à temperatura ambiente ou sob aquecimento, por ex., numa gama de temperaturas compreendida entre cerca de -80°C e cerca de $+200^\circ\text{C}$, de preferência, entre cerca de -20°C e cerca de $+150^\circ\text{C}$ e, se for necessário, num reactor fechado, sob pressão e/ou numa atmosfera de um gás inerte, tal como azoto.

Bases apropriadas são, por ex., hidróxidos, hidretos, amidas alcanolatos, carbonatos, trifenilmetilidas, dialquilo inferior-amidas, amino-alquilo inferior-amidas e alquilo inferior-sililamidas de metais alcalinos, ou naftalenoaminas, alquilo inferior-aminas, compostos heterocíclicos básicos, hidróxidos de amónio e aminas carbocíclicas. Exemplos que convém referir são: hidroxido de sódio, hidreto de sódio, amida de sódio, etanolato de sódio ou carbonato de sódio, terc.-butanolato ou carbonato de potássio, trifenilmetilida de lítio, diisopropilamida de lítio, 3-(aminopropil)-amida de potássio ou bis-(trimetilsilil)-amida de potássio, ou ainda dimetilaminonaftaleno, di- e tri-etilamina, piridina, hidróxido de benzil-trimetilamónio, 1,5-diaza-biciclo[4.3.0]-non-5-eno (DBN) e 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-5-eno (DBU).

Agentes apropriados capazes de se ligar ao enxofre, para a reacção com compostos de fórmula IIa, em que Z_1 e Z_2 , em conjunto, representam tioxo, são, por ex., óxidos de fósforo, tais como deca-óxido de tetra-fósforo, carbodiimidas, tal como carbodiimida de N,N'-díciclohexilo, bem como derivados do ácido carbónico, tais como ésteres do ácido carbónico, por ex., ésteres de alquilo inferior de ácido halo-carbónico, tais como ésteres etílicos de ácido clorocarbónico.

em que Y representa um radical acilo, ou com um dos seus sais.

Radicais acilo Y são, por ex., radicais acilo derivados de um ácido carboxílico ou sulfônico orgânico.

Acilo derivado de um ácido carboxílico orgânico representa, por ex., o radical de um ácido carboxílico alifático ou monocíclico, aromático, tal como alcanóilo inferior ou benzoílo insubstituído ou substituído, e também piridoílo.

Acilo derivado de um ácido sulfônico orgânico representa, por ex., alcano inferior-sulfonilo.

Alcanóilo inferior é, por ex., C₂-C₅-alcanóilo, tal como acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo ou pivalóilo.

Benzóilo insubstituído ou substituído é, por ex., benzoílo, p-clorobenzoílo ou p-nitrobenzoílo.

Alcano inferior-sulfonilo é, por ex., C₁-C₄-alcanossulfonilo, tal como metano- ou etano-sulfonilo.

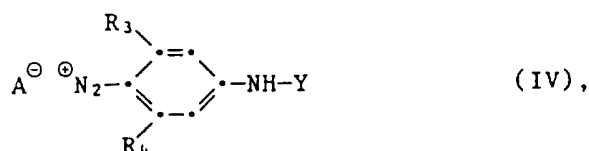
A hidrólise de um composto de fórmula III ou de um dos seus sais, realiza-se de maneira usual, por ex., na presença de um agente de hidrólise e, eventualmente, na ausência ou, geralmente, na presença de um solvente ou diluente inerte, apropriado, ou numa mistura correspondente, e a operação realiza-se, de acordo com as necessidades, sob arrefecimento, à temperatura ambiente ou sob aquecimento, por ex., numa gama de temperaturas compreendida entre cerca de -80°C e cerca de +200°C, de preferência, entre cerca de -20°C e cerca de +150°C e, se for necessário, num reactor fechado,

sob pressão e/ou numa atmosfera de um gás inerte, tal como azoto.

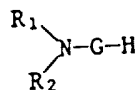
Agentes hidrolisantes adequados são, por ex., ácidos ou bases. Ácidos apropriados são, por ex. ácidos protónicos, inorgânicos ou orgânicos, tais como ácidos minerais, por ex., ácido sulfúrico ou ácidos halídricos, por ex., ácido clorídrico, ácidos sulfónicos, por ex., ácidos sulfónicos de alcanos inferiores, ou ácidos benzenossulfónicos insubstituídos ou substituídos, por ex., ácido metano- ou p-tolueno-sulfónico, ou ácidos carboxílicos, por ex., ácidos carboxílicos, por ex., ácidos carboxílicos de alcanos inferiores, por ex., ácido acético, ao passo que bases apropriadas são, por ex., aquelas atrás mencionadas, em especial hidróxido de sódio ou de potássio.

Diluentes ou dissolventes inertes, apropriados, são sobretudo aqueles referidos atrás, mais especialmente, água e alcanóis inferiores aquosos, tal como metanol ou etanol aquosos.

O composto de partida de fórmula III ou um dos seus sais pode ser preparado análogamente a métodos conhecidos, por ex., por meio da reacção de um sal de fórmula



em que A representa o anião de um ácido protónico, com um composto de fórmula



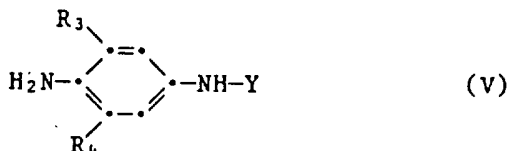
(IVa)

ou com um dos seus sais.

Aniões A de ácidos protônicos, em sais de fórmula IV, são, por ex., aniões dos ácidos referidos atrás para a formação de sais de adição dos compostos de fórmula I, em especial aniões de fortes ácidos protônicos inorgânicos, tais como aniões de ácidos minerais, por ex., ácido sulfúrico, um ácido fosfórico ou um ácido halídrico, ou de um ácido tetrafluorobórico, ou aniões de fortes ácidos carboxílicos orgânicos, tais como ácidos carboxílicos de alcanos inferiores, por ex., ácido fórmico ou ácido acético, por ex., o ião sulfato, fosfato, cloreto, brometo, tetrafluoroborato ou acetato.

A reacção de um sal de fórmula IV com um composto de fórmula IVa ou com um dos seus sais, realiza-se análogamente a processos conhecidos, nas usuais condições reaccionais, por ex., num solvente ou diluente inerte, por ex., do género atrás mencionado, de preferência, na água, eventualmente na presença de um agente ácido, por ex., na presença de um dos ácidos atrás referidos e/ou sob arrefecimento, à temperatura ambiente, sob aquecimento, por ex., numa gama de temperaturas compreendidas entre cerca de -20°C e cerca de +50°C, de preferência, entre cerca de 0 e cerca de +30°C.

O composto de partida de fórmula IV é conhecido ou pode ser preparado análogamente a métodos usuais, por ex., pela reacção de um composto de fórmula



ou de um dos seus sais, com ácidos nitroso; a reacção decorre nas condições reaccionais normalmente adoptadas, por ex., num solvente ou diluente, de preferência, na água, e/ou sob arrefecimento, à temperatura ambiente ou sob aquecimento, por ex., numa gama de temperaturas compreendida entre cerca de -20°C e cerca de $+50^{\circ}\text{C}$. Depreferredência, o ácido nitroso produz-se in situ, por ex., pela reacção de um hidrito de um metal alcalino, tal como nitrito de sódio, com um forte ácido protónico, por ex., um ácido halídrico, tal como ácido clorídrico, ou um ácido carboxílico de alcanos inferiores, tal como ácido fórmico ou ácido acético glacial.

Segundo uma forma de realização especialmente preferida, um composto de fórmula V ou um dos seus sais é levado a reagir, tal como atrás se refere, com ácido nitroso, que, pode por ex., se forma in situ, e o sal de fórmula IV, que se obtém em primeiro lugar, continua a reagir, sem ser isolado e/ou purificado adicionalmente, in situ, segundo o processo do invento, com um composto de fórmula IVa ou com um dos seus sais, para se obter o desejado composto de fórmula III.

Os compostos IVa e seus sais são compostos conhecidos ou podem ser preparados análogamente a

métodos conhecidos.

Também se conhece o composto de partida de fórmula IIa ou este pode ser preparado análogamente a métodos usuais.

Os sais dos compostos de fórmula I podem obter-se de maneira usual. Assim, por ex., obtêm-se sais de adição de ácidos de compostos de fórmula I mediante tratamento com um ácido ou um apropriado reagente permutador de iões. Os compostos acídicos de fórmula I podem ser convertidos em sais com bases, por ex., mediante tratamento com uma base ou com um adequado reagente permutador de iões. Sais de compostos de fórmula I podem ser transformados nos compostos livres de fórmula I, de forma usual; por ex., sais de adição de ácidos podem ser transformados nos compostos livres mediante tratamento com um agente básico apropriado, e sais com bases podem ser transformados nos compostos livres, por ex., mediante tratamento com um agente acídico apropriado.

Consoante a natureza do processo adoptado e as condições reaccionais, os compostos de fórmula I com propriedades halogénicas, em especial, propriedades acídicas, podem obter-se na forma de compostos livres ou na forma de sais.

Em consequência da estreita relação existente entre o novo composto de fórmula I na forma livre e na forma dos seus sais a menção de um composto livre de fórmula I ou dos seus sais implica também a existência dos correspondentes sais ou do composto livre de fórmula I, respectivamente, sempre que isso seja apropriado e útil.

Os novos compostos de fórmula I, inclusivé os seus sais, podem também obter-se na forma dos seus hidratos ou eles podem incluir outros solventes, por ex., aqueles que se utilizam para a cristalização de compostos exis



tentes na forma de sólidos.

De acordo com o género de compostos de partida e segundo os processos escolhidos, os novos compostos de fórmula I podem estar presentes sob a forma de um dos isómeros possíveis ou na forma de uma mistura isómera. Consoante a simetria molecular, por ex., segundo o número e a configuração absoluta e relativa dos centros quirais, como átomos de carbono assimétricos, podem obter-se como isómeros puros, por ex., enantiómeros puros e/ou diastereómeros puros, tais como cis-/trans-isómeros puros ou compostos mesógiros.

Assim, por conseguinte, podem obter-se como misturas isómeras, por ex., misturas enantiómeras, tais como racematos, misturas diastereómeras ou misturas de racematos.

As misturas diastereómeras e as misturas de racematos resultantes podem ser separadas nos diastereómeros puros ou racematos puros, de maneira usual, com base nas diferenças de ordem físico-química entre os componentes, por ex., por meio de cristalização fraccionada.

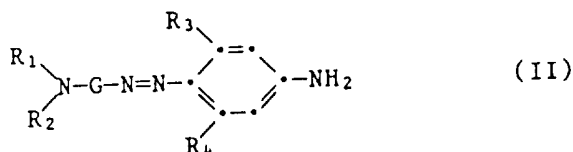
As misturas enantiómeras resultantes, tais como racematos, podem ser resolvidas nos enantiómeros mediante métodos conhecidos, por ex., por meio de recristalização a partir de um solvente, ópticamente activo, por meio de cromatografia em adsorvantes quirais, com o auxílio de microrganismos apropriados, mediante clivagem por enzimas específicas, imobilizadas, mediante a formação de compostos de inclusão (clatratos), utilizando, por ex., éteres coronários quirais, sendo que, neste caso, apenas se dá complexação de um dos enantiómeros, ou por meio de conversão em sais diastereómeros, por ex., por meio de reacção de um racemato básico como produto final, com um ácido, ópticamente activo, tal como um ácido carboxílico, por ex., ácido tartárico ou ácido málico, ou um ácido sulfónico, por ex., ácido canforossulfónico, e se-

paração da mistura de diastereómeros obtida desta maneira, por ex., com base nos seus diferentes graus de solubilidade, nos diastereómeros, a partir dos quais se pode libertar o desejado enantiómero pela acção de agentes apropriados. Com vantagem, isola-se o enantiómero mais activo.

O presente invento refere-se também àquelas formas do processo de preparação segundo as quais um composto obtível como composto intermédio numa qualquer das fases do processo é utilizado como composto de partida e se realizam as respectivas etapas do processo, ou se usa um composto de partida na forma de um derivado ou sal e/ou na forma dos seus racematos ou enantiómeros ou, em especial, se forma o composto de partida nas condições reaccionais.

No processo de preparação do presente invento prefere-se utilizar aqueles compostos de partida que dêem origem à formação dos compostos de fórmula I, especialmente valiosos, descritos no início da presente memória. O invento refere-se também a um processo para a preparação de novos compostos de partida, especialmente concebidos para a preparação dos compostos de fórmula I, bem como se refere à utilização destes compostos de partida; as variáveis R_1 a R_6 , G e L têm os significados referidos para os grupos de compostos de fórmula I, que se preferem, em cada caso.

Neste contexto, convém mencionar sobretudo a preparação de compostos de fórmula



e dos seus sais, à qual se aplicam também as observações atrás feitas em relação aos sais dos compostos de fórmula I. Estes compostos podem ser utilizados, de maneira especialmente vantajosa, como compostos de partida para a preparação de compostos de fórmula I ou dos seus sais, por ex., segundo o processo atrás descrito.

Por conseguinte, o presente invento refere-se também à preparação de compostos de fórmula II, em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, e G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído ou um grupo 1,4-naftileno insubstituído ou substituído, e aos seus sais, e à utilização destes compostos e seus sais.

As variáveis na fórmula II têm, por ex., os significados preferidos, indicados na fórmula I.

Assim, o presente invento refere-se em especial à preparação de compostos de fórmula II, e dos seus sais em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, e G representa 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo, ou um grupo 1,4-naftileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo.

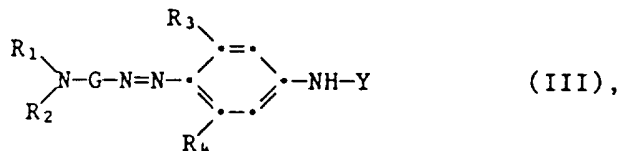
Mais especialmente, o invento refere-se à preparação de compostos de fórmula II e dos seus sais, em que R_1 representa C_1 - C_4 -alquilo, tal como metilo ou etilo, R_2 representa C_1 - C_4 -alquilo, tal como metilo ou etilo, R_3 representa hidrogénio ou sulfo, R_4 representa sulfo e G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por sulfo.

~~_____~~

Ainda mais especialmente, o presente invento refere-se à preparação de compostos de fórmula II e dos seus sais, em que R₁ representa C₁-C₄-alquilo, tal como metilo, R₂ representa C₁-C₄-alquilo, tal como metilo, R₃ representa hidrogénio, R₄ representa sulfo, e G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído.

Especificamente, o presente invento refere-se à preparação dos novos compostos de fórmula II, referidos nos exemplos práticos, e se refere aos seus sais.

O processo do invento para a preparação de um composto II ou de um dos seus sais, caracteriza-se, por ex., pela hidrólise de um composto de fórmula



em que Y representa um radical acilo, ou de um dos seus sais, por ex., tal como se refere atrás, e, caso se desejar, se separa uma mistura isómera obtida nos seus componentes e se isola o desejado isómero de fórmula II, se resolve uma mistura de enantiómeros ou diastereómeros obtidos nos enantiómeros ou diastereómeros individuais e se isola o desejado enantiómero ou diastereómero, e/ou se converte num sal um composto livre de fórmula II obtido ou se transforma um sal obtido segundo o processo do invento no composto livre de fórmula II ou num outro sal.

A preparação de compostos III ou dos seus sais descrevem-se atrás.

Operações subsequentes que, caso se desejar, podem ser efectuadas sobre os compostos II ou seus sais, obteníveis segundo o processo ou por outros métodos, são em especial, separações de enantiómeros ou diastereómeros e a mútua transformação de sais e compostos livres de fórmula II, análogas àquelas referidas para os compostos I, operações essas que se realizam também de forma análoga.

O presente invento refere-se também à utilização de compostos de fórmula II ou dos seus sais como compostos de partida para a preparação de compostos de fórmula I ou dos seus sais.

O processo optimizado, atrás referido, para a modificação química de proteínas e para a análise da estrutura primária destas proteínas quimicamente modificadas, isto é, a sequência, constituída pela modificação química por meio de um composto de fórmula I ou de um dos seus sais, desnaturação eventual, tratamento com uma protease e HPLC, pode também ser efectuado de forma automático, mediante um dispositivo especificamente concebido para este fim.

A estrutura do referido dispositivo automático está apresentada, esquematicamente, na figura 1. O referido dispositivo é constituído por uma bomba de injeção (24), que serve para fornecer ao reactor (15) uma amostra da proteína, que se pretende modificar quimicamente mediante um composto I ou um dos seus sais, solventes, reagentes e/ou catalisadores, que são necessários para as mencionadas etapas da modificação química mediante um composto de fórmula I ou um dos seus sais, desnaturação eventual e tratamento com uma protease, gás inerte e solução de purificação (lavagem), através do elemento de ligação (1); o reactor (15), é constituído por uma tampa roscada (16) e encontra-se instalado no interior de

um invólucro aquecedor (14); por uma bomba de vácuo (25), que, através do elemento de ligação (2), permite a evacuação do reactor (15) para a concentração do conteúdo do reactor (15), por um elemento de ligação (3), que, através de uma ligeira sobrepressão de um gás inerte fornecido a partir da bomba de injeção (24), por meio do elemento de ligação (1), serve para fornecer o conteúdo do reactor (15), à unidade de dessalgação (19), uma vez efectuada a etapa da modificação química ou da desnaturação eventual, através da válvula (26), do elemento de ligação (5), da válvula (27) e do elemento de ligação (9), ou serve para transportar o conteúdo do reactor (15), para a unidade de HPLC (21), após a realização da etapa do tratamento com uma protease, através da válvula (26), do elemento de ligação (5), da válvula (27) e do elemento de ligação (7); a unidade de HPLC (21) apresenta um dispositivo de registo ('plotter') (22) e, através do elemento de ligação (8), um colector de fracções (20), ou serve para fornecer ao depósito de líquidos residuais (17) a solução de lavagem contida no reactor (15) através da válvula (26) e do elemento de ligação (11); uma bomba (23) que fornece à unidade de dessalgação (19) o eluente através do elemento de ligação (6), da válvula (27) e do elemento de ligação (9); um elemento de ligação (10), que serve para transmitir ao detector (18) o eluato eluído a partir da unidade de dessalgação (19); o referido detector (18) serve para regular a válvula (28) de modo tal que o eluato eluído a partir da unidade de dessalgação (19), quando contenha a proteína quimicamente modificada, preparada na etapa de modificação química ou, eventualmente, a proteína desnaturada, quimicamente modificada, preparada na etapa de desnaturação facultativa, seja fornecido ao reactor (15), através do elemento de ligação (4), e se não contiver uma proteína quimicamente modificada ou uma proteína desnaturada, quimicamente modificada, o eluato seja fornecido ao depósito de líquidos residuais (17), através do elemento de ligação (12), bem como apresenta um elemento de ligação (13), que serve para fornecer o eluato do detector (18) à válvula (28). O resíduo dispositivo abrange os componentes (1) a (28).

Em termos de tamanho e forma, o reactor (15) pode ser comparado a um tubo de Eppendorf (1,5 ml). O reactor (15) pode ser feito de qualquer material inerte, por ex., de vidro, material plástico praticamente inerte, tal como politetracloroetileno, ou de aço inoxidável de boa qualidade, de preferência de um material transparente, por ex., de vidro ou material plástico transparente, praticamente inerte. As etapas de modificação química, desnaturação facultativa e tratamento com uma protease, realizam-se na parte inferior, pontiaguda, do reactor, com um volume reaccional total de cerca de 100 a cerca de 300 μ l. O reactor pode ser tapado mediante a tampa roscada (16) que, de preferência, é feita do mesmo material que o reactor (15). O elemento de ligação (3) deverá aproximar-se o mais possível do fundo do reactor, a fim de permitir uma evacuação, praticamente completa, do reactor (15).

A bomba injectora (24) pode introduzir no reactor (15) o eduto (a proteína que se pretende modificar quimicamente), os necessários solventes, reagentes, por ex., o composto de fórmula I ou um dos seus sais, utilizado na etapa da modificação química, e/ou catalisadores, bem como gás inerte e solução de lavagem. A bomba injectora (24) é um dispositivo que se pode adquirir ao comércio da especialidade, e cuja configuração permita dosear, em qualquer altura, e de forma independente, o género e a quantidade do agente que se pretende introduzir no reactor (15). Mediante uma válvula praticada na bomba injectora (24), o elemento de ligação (1), que conduz ao reactor (15), pode ser obstruído em qualquer altura, por ex., logo que a desejada quantidade do agente tiver sido bombeada para dentro do reactor (15).

As quantidades que podem ser bombeadas, numa única etapa, para dentro do reactor (15) poderão variar dentro de largos limites volumétricos, por ex., entre cerca de 1 μ l e cerca de 200 μ l.

Como bomba de vácuua (25) serve qualquer bomba industrial, de preferência, uma bomba de óleo. A unidade de dessalgação (19) serve para remover o excesso de reagentes e produtos secundários contidos na mistura reaccional, que se formam a seguir à etapa da modificação química e à etapa da modificação química e à etapa da desnaturação facultativa. Para a unidade de dessalgação (19) podem utilizar-se dispositivos de separação cromatográfica usuais, por ex., dispositivos usados para a cromatografia em coluna, tal como cromatografia de exclusão molecular, por ex., cromatografia em gele. O detector (18) funciona de preferência com base no comportamento em termos de absorção de luz das moléculas, por ex., no comportamento em termos de absorção de luz a comprimentos de onda que se situem no ultravioleta ou, em especial, na zona de luz visível. Comprimento de onda típicos são aqueles que se indicam atrás em relação ao detector do sistema de HPLC. Componentes industriais apropriados podem ser utilizados para servirem de camisa de aquecimento (14), depósito de águas residuais (17), colector de fracções (20), componente de HPLC (21), aparelho de registo ('plotter') (22) e bomba (23), que fornece o eluente à unidade de dessalgação (19).

Por um lado, a válvula (26) pode abrir os elementos de ligação (3) e (5) e, ao mesmo tempo, fechar o elemento de ligação (11).

Por outro lado, a válvula (26) pode abrir os elementos de ligação (3) e (11) e, simultâneamente, fechar o elemento de ligação (5). A válvula (27) poderá abrir os elementos (5) e (9) e, ao mesmo tempo, fechar os elementos (6) e (7), ou pode abrir os elementos (5) e (7) e, ao mesmo tempo, fechar os elementos (6) e (9), ou também abrir os elementos (6) e (9) e, ao mesmo tempo, fechar os elementos (5) e (7). A válvula (28) pode abrir os elemntos de ligação (4) e (13) e, ao mesmo tempo, fechar os elementos (12), ou pode abrir os elementos de ligação (12) e (13) e, ao mesmo tempo, fechar o elemento de ligação (4). Podem usar-se válvulas industriais,

de tipo adequado.

Os elementos de ligação (1) e (3) podem ser fabricados de qualquer material inerte, por ex., vidro ou material plástico, praticamente inerte, tal como politetrafluoroetileno, de preferência, de um material transparente, por ex., de vidro ou de um material plástico transparente, praticamente inerte. O elemento de ligação (2) é feito de um tubo resistente ao vácuo.

Em mais pormenor, realiza-se da seguinte maneira a sequência de reacções: Uma solução da proteína, que se pretende modificar quimicamente por um composto de fórmula I ou um dos seus sais, é introduzida no reactor (15), por actuação da bomba injectora (24), através do elemento de ligação (1). Em seguida, uma solução do reagente (um composto de fórmula I ou um dos seus sais) é guiada para o reactor (15) da mesma maneira.

Terminada a etapa da modificação química, gera-se uma ligeira sobrepressão de um gás inerte, por ex., árgon, no reactor (15) (o gás inerte é fornecido a partir da bomba injectora (24), através do elemento de ligação (1)). A sobreposição faz com que o conteúdo do reactor (15) seja transportado para a unidade de dessalgação (18), através dos elementos (3), (26), (5), (27) e (9). Procedese à regulação apropriada das válvulas (26) e (27). O elemento de ligação (4) é fechado mediante a válvula (28). Depois de a totalidade do conteúdo do reactor (15) ter sido transferida para a unidade de dessalgação (19), alivia-se a sobrepressão. Em seguida, a amostra atravessa a unidade de dessalgação (19), para ser purificada, e a bomba (23) fornece o eluente por meio dos elementos (6), (27) e (9). (a válvula (27) é regulada de forma apropriada). Por meio dos elementos (10), (18), (13), (28) e (4), a proteína purificada, quimicamente modificada, é reenviada ao reactor (15), tendo sido ajustada a válvula (28) de forma apropriada para este fim. O detector (18) serve

para regular a válvula (28) de modo tal que apenas aquela fracção do eluato que contém o produto desejado seja fornecida ao reactor (15), enquanto as restantes fracções são directamente transmitidas, através do elemento de ligação (12), para o depósito de líquidos residuais (17). O conteúdo do reactor (15) (eluato com proteína purificada, quimicamente modificada) é concentrado, gerando-se, através do elemento de ligação (2), um vácuo pela acção da bomba de vácuo (25).

Durante a criação do vácuo, o elemento de ligação (1) é fechado pela acção da válvula que se encontra na bomba injectora. Estão igualmente fechados os elementos de ligação (3) e (5) (mediante a válvula (27) e o elemento de ligação (4), mediante a válvula (28).

Quando se pretende realizar o processo de desnaturação, procede-se de modo análogo ao referido em relação à etapa da modificação química, utilizando-se os reagentes e dissolventes apropriados. A esta etapa de desnaturação segue-se então de novo uma etapa de purificação, em que se usa de forma análoga a unidade de dessalgação (19). O resultante eluato é de novo enviado ao reactor (15), onde é concentrado.

Por último, realiza-se no reactor (15) o passo do tratamento com uma protease de maneira análoga à indicada para o passo da modificação química, utilizando-se, igualmente, os reagentes e solventes apropriados. Uma vez terminado o tratamento com a protease, o conteúdo do reactor (15) é transferido para o componente de HPLC do sistema (21), por via dos elementos (3), (26), (5), (27) e (7) (as válvulas (26) e (27) são reguladas de maneira adequada), procedendo-se de maneira análoga à descrita atrás (gerando-se uma ligeira sobrepressão do gás inerte). A seguir à realização da HPLC, o correspondente cromatograma aparece no dispositivo de registo ('pletter') (22). As fracções obtidas na HPLC podem ser colhi-

das mediante o colector de fracções (20).

As condições reaccionais (temperatura, volume, período reaccional, etc.) bem como o gradiente da HPLC são controladas por meio de um programa previamente estabelecido.

Quaisquer catalisadores ou outros aditivos agentes ou auxiliares, necessários para a realização das referidas reacções podem ser introduzidas no reactor (15) mediante a bomba injector (24), passando pelo elemento de ligação (1).

O dispositivo do invento é utilizado de modo que, por um lado, a unidade de dessalgação (19) seja lavada continuamente com o eluente aduzido da bomba (23), enquanto uma reacção (modificada química, desnaturação facultativa ou tratamento com protease) está a decorrer no reactor (15), e, por outro lado, o reactor (15) seja depurado com a solução de lavagem (introduzida pela bomba injectora (24) através do elemento (1)), enquanto a amostra (proteína químicamente modificada ou proteína químicamente modificada e eventualmente desnaturada) está a ser purificada na unidade de dessalgação (19). A solução de lavagem da unidade de dessalgação (19) é introduzida no depósito de águas residuais (17) através dos elementos (10), (18), (13), (28) e (12), e a solução de lavagem do reactor (15) é introduzida no depósito de águas residuais (17) através dos elementos (3), (26) e (11); procede-se, em cada caso, tal como se refere no caso da transferência dos produtos e eluatos.

O presente invento refere-se também a um processo para a preparação de um dispositivo do género descrito atrás, e que se destina especificamente à realização automática da sequência de etapas, constituída pela modificação química de um proteína por meio de um composto de fórmula I ou de um dos elementos e dos seus sais, pela desnatura-

ção facultativa da proteína quimicamente modificada, pelo tratamento com uma protease da proteína quimicamente modificada e eventualmente desnaturada, e pela HPLC da mistura peptídica resultante do passo do tratamento com a protease, processo caracterizado por se combinarem os componentes do referido dispositivo da maneira atrás mencionada, a fim de se obter o desejado dispositivo.

O presente invento refere-se também a um processo para a modificação química automática de uma proteína e para a análise automática da estrutura primária de uma proteína quimicamente modificada, constituída pela sequência de passos atrás referida, processo caracterizado por se tratar a proteína mediante o dispositivo atrás descrito.

O invento refere-se também à utilização do dispositivo atrás descrito para a realização automática da sequência atrás referida, bem como se refere à utilização de um composto de fórmula I ou um dos seus sais, como reagente na etapa da modificação química realizada mediante o referido dispositivo.

O invento refere-se igualmente aos seguintes exemplos práticos, que servem para ilustrar melhor o invento, sem, no entanto, limitar-lhe o alcance inventivo. As temperaturas estão referidas em graus centígrados. HPLC significa cromatografia líquida de elevado rendimento. Lis representa lisina. Val representa valina.

EXEMPLO 1

25 ml de uma solução 0,24M de carbonato de sódio e 0,91 g (7,9 mmoles; 0,6 ml) de tiofosgênio são adicionados a 1 g (3,1 mmoles) de ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico. A mistura reaccional é agitada, durante 30 minutos, a 70°C. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente, o produto resultante é filtrado, mediante um filtro de vidro fritado e o filtrado é lavado energeticamente, com ácido clorídrico 1N, tolueno e novamente com ácido clorídrico 1N. Em seguida, os cristais negros são secos num vazio, à temperatura ambiente, obtendo-se o ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfônico. Quando aquecido, o produto começa a decompor-se e não apresenta qualquer ponto de fusão definido; o espectro do infra-vermelho apresenta uma banda nítida, a 2110 cm^{-1} , causada pela vibração de distensão assimétrica do grupo $\text{N}=\text{C}=\text{S}$.

O ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico pode obter-se, por ex., da seguinte maneira:

0,9 g (8,5 mmoles) de carbonato de sódio anidro e 38 ml de água são adicionados a 3,5 g (15 mmoles) de ácido 5-(N-acetilamino)-2-aminobenzenossulfônico. A mistura reaccional é agitada até se obter uma solução límpida. Em seguida, esta solução é arrefecida até +10°C, mediante um banho de gelo. A seguir à adição de 1,22 g (17,7 mmoles) de nitrito de sódio sólido, a mistura é agitada durante mais 2 minutos. Em seguida, a mistura reaccional é deitada sobre uma mistura de 3,5 ml de ácido clorídrico concentrado e 25 g de gelo triturado. Continua-se a agitar durante um período adicional de 30 minutos, a 0°C e, seguidamente, junta-se, à mistura reaccional, uma solução de 2,01 g (16,6 mmoles; 2,1 ml) de N,N-dimetilanilina, em 3 ml de ácido acético glacial. Deixa-se que a temperatura da

mistura aumente até à temperatura ambiente, durante um período de 3 a 4 horas. O produto precipitado é filtrado e é seco, durante a noite, num vazio, à temperatura ambiente, obtendo-se ácido 4-(N-acetilamino)-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico sob a forma de cristais negro-purpúreos, que se decompõem quando aquecidos e que não apresentam qualquer ponto de fusão definido.

2 g (5,5 mmoles) De ácido 4-(N-acetilamino)-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico são dissolvidos em 8 ml de etanol. Após adição de 4 ml de uma solução 11N de hidróxido de sódio, a mistura é agitada durante 60 minutos, a 90°C. Em seguida, a mistura é deixada em repouso para arrefecer até à temperatura ambiente, juntando-se, seguidamente, 5 ml de ácido clorídrico 11,5 N. Em seguida, a mistura reaccional é deixada em repouso, durante uma noite, a +4°. O produto precipitado é separado, por filtração, e é lavado exaustivamente, com ácido clorídrico 1N. Após a secagem num vácuo, à temperatura ambiente, obtém-se o ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico sob a forma de cristais negros a purpúreos, que se decompõem quando aquecidos, e que não apresentam ponto de fusão definido.

EXEMPLO 2

0,67 g (2,1 mmoles) De ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico (exemplo 1) são dissolvidos em 5 ml de piridina absoluta. Em seguida, a solução é gotejada, sob agitação, e sob arrefecimento com gelo/cloreto de sódio, para uma mistura de 424 mg (2,1 mmoles) de carbodiimida de N,N'-díciclohexilo, 5 ml de piridina anidra e 1,26 g (16,6 mmoles; 1 ml) de dissulfureto de carbono. Se-

guidamente, a mistura reaccional é agitada durante 3 a 4 horas sem remover o banho de refrigeração. A mistura é deixada em repouso, à temperatura ambiente, durante um período de 17 horas. A piridina e o excesso do dissulfureto de carbono são removidos da maneira mais completa possível, sob pressão reduzida. A seguir à cromatografia em coluna do resíduo, sobre sílica-gel (150 a 200 melhas) (eluente:benzeno), obtém-se ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfônico, que começa a cristalizar quando o eluato é concentrado, por evaporação.

EXEMPLO 3

0,67 g (2,1 mmoles) De ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico (Exemplo 1) são dissolvidos em 5 ml de piridina absoluta. Juntam-se, sob agitação e arrefecimento, com gelo, 1,26 g (16,6 mmoles; 1 ml) de dissulfureto de carbono e 0,22 g (2,2 mmoles; 0,3 ml) de trietilamina. Em seguida, a mistura reaccional é agitada, durante 3 a 4 horas, sem remover o banho de refrigeração. A mistura é deixada em repouso, durante 17 horas, à temperatura ambiente, e, em seguida, é concentrada, até à secagem, por evaporação.

O ditiocarbamato de trietilamônio remanescente (resíduo) é seco durante a noite, num vácuo e, em seguida, é dissolvido em 12 ml de triclorometano. Juntam-se, à solução, 0,22 g (2,2 mmoles; 0,3 ml) de trietilamina, sob arrefecimento com gelo. Em seguida, juntam-se a esta mistura, gota a gota, dentro de um período de 4 minutos, 0,34 g (3,1 mmoles; 0,3 ml) de clorocarbonato de etilo, sob agitação e arrefecimento com gelo. A mistura reaccional é deixada em

repouso durante 3 a 4 horas, sem remover o banho de refrigeração e, em seguida, é concentrada, até à secagem, por evaporação, sob pressão reduzida. O produto bruto remanescente (resíduo) é purificado por meio de cromatografia em coluna, tal como se refere no exemplo 2, obtendo-se ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-2-sulfônico.

EXEMPLO 4

Procedendo de maneira análoga à descrita nos exemplo 1 a 3, e partindo de ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2,6-dissulfônico e ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-(4'-aminobenzeno-2'-sulfônico, é também possível obterem-se, respectivamente, ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2,6-dissulfônico e ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-(4'-isotiocianatobenzeno-2'-sulfônico).

Os compostos de partida podem obter-se de maneira análoga à referida no Exemplo 1, partindo-se de ácido 4-(N-acetilamino)-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2,6-dissulfônico e ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-[4'-(N-acetilamino)-benzeno-2'-sulfônico], respectivamente.

EXEMPLO 5

20 ml de clorobenzeno são arrefecidos até 0°, com gelo/cloreto de sódio. Introduzem-se no clorobenzeno arrefecido 1,1 g (11,1 mmoles) de fosgênio, por condensação, observando-se os cuidados usuais. Sem remover o banho de refrigeração e sob agitação enérgica, adiciona-se uma solução de 1,79 g (5,6 mmoles) de ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfónico (Exemplo 1), em 30 ml de clorobenzeno, gota a gota, a uma velocidade tal que a temperatura da mistura reaccional não ultrapasse os +25°C. Terminada a adição gota a gota, substitui-se o banho de refrigeração por um banho de aquecimento, através do qual a mistura reaccional é aquecida até 130°C, dentro de um período de 90 minutos; continua-se sempre a manter uma agitação constante. Durante esta operação, e logo que a mistura reaccional tenha atingido uma temperatura de 75°C, introduz-se lentamente mais fosgênio, até se formar uma solução límpida. A mistura reaccional é aquecida, ao refluxo, faz-se passar nitrogénio através da mistura, até na corrente de gás evacuada já não se detectar a presença de fosgênio (cerca de 2 horas). Depois de arrefecer até à temperatura ambiente, a mistura reaccional é concentrada da maneira mais exaustiva possível, sob pressão reduzida. Após cromatografia em coluna do resíduo, em sílica-gel (150 a 200 mesh), com benzeno como eluente, obtém-se ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isocianato-azobenzeno-2-sulfónico, que começa a cristalizar quando se concentra o eluato, por evaporação

EXEMPLO 6

Procedendo de maneira análoga à indicada no exemplo 5, e partindo de ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2,6-dissulfônico e de ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo(4'-aminobenzeno-2'-sulfônico) podem obter-se ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isocianato-azobenzeno-2,6-dissulfônico e ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-(4'-isocianatobenzeno-2'-sulfônico), respectivamente.

Cada um dos compostos de partida podem obter-se de maneira análoga à referida no exemplo 4.

EXEMPLO 7

1,8 g (9,7 mmoles) De ácido iodoacético e 1,2 g (6,3 mmoles) de hidrocloreto de N-[3-(N,N-dimetilamino)-propil]-N'-etilcarbodiimida são dissolvidos em 9 ml de água. A solução resultante é misturada, imediatamente, sob agitação, com uma solução de 0,5 g (1,6 mmoles) de ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico (Exemplo 1), em 7,6 ml de uma solução-tampão (pH = 9), constituída por 50 mM de uma solução de hidrogenocarbonato de sódio e 50 mM de uma solução de carbonato de sódio. Em seguida, gotejam-se 0,4 ml de uma solução 11N de hidróxido de sódio para a mistura obtida, que, em seguida, é agitada durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, junta-se, gota a gota, ácido clorídrico 1N, até a mistura reaccional apresentar uma coloração purpúrea. O produto precipitado é separado por filtração, é lavado enérgicamente com 100 ml de ácido clorídrico 0,1N e é seco num vazio. O produto seco, bruto, é dissolvido

numa mistura de 16 ml de N,N-dimetilformamida e 0,4 ml de trietilamina. A seguir à precipitação subsequente, com ácido clorídrico 1N, da maneira atrás referida, após filtração e secagem do conteúdo do filtro, num vácuo, obtém-se o ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-(N-iodoacetil)-amino-azobenzeno-2-sulfônico puro, que se decompõe quando aquecido e que não apresenta ponto de fusão definido.

EXEMPLO 8

Procedendo de maneira análoga à referida no exemplo 7, e partindo de ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2,6-dissulfônico e de ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-(4'-aminobenzeno-2'-sulfônico, podem também obter-se ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-(N-iodoacetil)-amino-azobenzeno-2,6-dissulfônico e ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-[4'-(N-iodoacetil)-aminobenzeno-2'-sulfônico], respectivamente.

Cada um dos compostos de partida podem obter-se de maneira análoga à referida no exemplo 4.

EXEMPLO 9

Anticorpos monoclonais que actuam de forma específica sobre a eglina C, são quimicamente modificados, à temperatura ambiente, durante um período de 18 ho-

ras, numa solução de 50 mM de hidrogenocarbonato de sódio, pela acção de uma solução 2 mM de ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico. A análise estrutural seguinte mostra de que cada molécula de anticorpo foi modificada químicamente por 30 moléculas de ácidos 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico. Com este grau de modificação, os anticorpos possuem uma especificidade e afinidade para a eglina C recombinante, que são inalteradas em relação aos anticorpos não-modificadas. Esses anticorpos, químicamente modificados, que foram também colorados, ao mesmo tempo, podem utilizar-se para comprovar a presença de eglina C por meio do teste de 'sandwich dot'. No referido ensaio é possível detectar concentrações de 1 µg/ml e concentrações mais elevadas.

EXEMPLO 10

Hirudina, um agente inibitório específico da trombina, é químicamente modificada, a 37°C, durante um período de 7 horas, numa solução 50 mM de hidrogenocarbonato de sódio, pela acção de uma solução 2mM de ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico. A hirudina modificada desta maneira é submetida a cromatografia em gel, numa coluna Sephadex G 25. Durante a modificação do referido agente inibidor, reagem 1,96 mmoles de ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico por cada mole de hidrudina. Procede-se à análise da estrutura do agente inibitório modificado e à sua actividade biológica, sendo reveladas as seguintes características:

a) A hirudina, químicamente modificada, apresenta uma reduzida actividade inibitória relativamente à trombina

conforme se pode inferir do facto de a correspondente constante de dissociação K_i ser 300 vezes maior.

b) Anticorpos monoclonados que actuam sobre hirudina nativa agem igualmente sobre a hirudina, quimicamente modificada.

c) Procede-se à carboximetilação e ao tratamento com a protease V8 de hirudina quimicamente modificada. Os péptidos resultantes são submetidos a HPLC. Detectam-se dois péptidos a um comprimento de onda de 536 nm. A análise estrutural mostra de que esses dois péptidos coloridos correspondem aos elementos constituintes amino-ácidos 1 a 7 e 18 a 37, e que os blocos constitutivos Val-1 e Lis-27 são modificados de forma selectiva por ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico.

EXEMPLO 11

Modifica-se quimicamente a antitrombina, à temperatura ambiente, durante um período de 15 minutos, numa solução 50 mM de hidrogenocarbonato de sódio, pela acção de uma solução 1 mM de ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico. A antitrombina modificada desta forma é submetida a cromatografia em gel, numa coluna de Sephadex G 25. Analisam-se a estrutura da antitrombina modificada e a sua actividade biológica, revelando-se as seguintes características:

a) A antitrombina, quimicamente modificada, conserva apenas 25% da sua actividade em termos de cofactor para heparina, enquanto que a sua acção inibitória sobre a trombina,

na ausência de heparina (acção inibitória progressiva) fica praticamente inalterada.

b) Procede-se à carboximetilação e ao tratamento com tripsina de antitrombina quimicamente modificada. Os péptidos resultantes são submetidos a HPLC. Detectam-se 3 péptidos a um comprimento de onda de 436 nm. A análise estrutural mostra de que esses 3 péptidos coloridos correspondem aos radicais amino-ácidos 91 a 111, 115 a 129 e 133 a 139, e que os blocos estruturais Lis-107, Lis-125 e Lis-136 são modificados de forma selectiva por ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azo-benzeno-2-sulfónico.

c) Ao incubar a antitrombina com heparina, antes daquela ser submetida à acção do ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico, a modificação química dos blocos estruturais Lis-107, Lis-125 e Lis-136 fica inibida em respectivamente 98%, 88% e 93%.

d) Por conseguinte, os blocos estruturais Lis-107, Lis-125 e Lis-136 da antitrombina humana são especialmente importantes para a combinação com a heparina.

EXEMPLO 12

Procedendo de maneira análoga à referida nos exemplos 9 a 11, podem também usar-se um outro composto de fórmula I ou um dos seus sais, por ex., procedendo de acordo com os exemplos 1 a 8, para a modificação química de uma proteína.

EXEMPLO 13

A análise do local para a combinação com a heparina da antitrombina humana, mediante um dispositivo do género representado na figura 1, pode realizar-se do seguinte modo:

a) A antitrombina humana (432 amino-ácidos) e o complexo de heparina-antitrombina são tratados, sucessivamente, da maneira descrita nos passos (b) a (g). O dispositivo utilizado nesses passos contém os componentes apresentados de forma esquemática na figura 1. O reactor (15) é constituído por vidro. O detector (18) funciona com base na absorção de luz de um comprimento de onda de 436 nm. Os elementos de ligação (1) e (3) a (13) são feitos de vidro. O elemento de ligação (2) é constituído por um tubo resistente a vácuo. Como bomba de vácuo (25) utiliza-se uma bomba de óleo. A unidade de dessalgação (18) compreende uma coluna Sephadex G 25.

b) Passo de modificação química

Dissolvente: solução 50mM de hidrogenocarbonato de sódio (pH = 8,3);

Amostra 1: antitrombina, 250 µg;

Amostra 2: complexo de heparina-antitrombina (2:1, partes em peso), 750 µg (250 µg de antitrombina e 500 µg de heparina)

Reagente de fórmula I para a modificação química:

solução 1mM de ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico, no solvente mencionado.

Volume de reacção: 200 µl;

Temperatura reaccional: +25°;

Tempo de reacção: 7,5 minutos.

c) Passo de dessalgação

Coluna: Sephadex G 25 (comprimento: 3,5 cm; diâmetro interno: 1 cm);

Eluente: solução 50 mM de hidrogenocarbonato de amônio (pH = 8,0).

d) Passo de desnaturação

Solvente: Solução 0,5M de hidrocloreto de α, α, α -tris-(hidroximetil)-metilamina ("Tris-hidrocloreto") (pH = 8,4) e solução 5M de hidrocloreto de guanidínio.

Volume de reacção: 200 μ l;

Reagente redutor: treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol (ditiotretitol, DIT), 1 mg;

Temperatura de redução: + 37°C;

Tempo de redução: 2 horas;

Reagente de carboximetilação: ácido iodoacético, 2 mg;

Temperatura de carboximetilação: + 37°C;

Duração da carboximetilação: 15 minutos.

e) Passo da dessalgação

Coluna: Sephadex G 25 (comprimento: 3,5 cm; diâmetro interno: 1 cm);

Eluente: solução 50 mM de hidrogenocarbonato de amônio (pH = 8,0).

f) Passo de tratamento com protease

Protease: tripsina, 10 ug;

Solvente: solução 50 mM de hidrogenocarbonato de amónio (pH = 8,0);

Volume de reacção: 100 µl;

Temperatura da reacção: +37°C;

Período reaccional: 2 horas.

g) Passo da HPLC

Coluna: Vydac C-18, para péptidos e proteínas;

Temperatura da coluna: + 25°C;

Solvente A: acetato de sódio 15,5 mM (pH = 5,0);

Solvente B: acetonitrilo;

Gradiente: linear, de 10% de B até 70% de B, dentro de 30 minutos;

Débito: 1 ml por minuto;

Detector: absorção de luz de comprimento de onda de 436 nm.

h) A comparação dos padrões dos picos nos dois cromatogramas obtidos da amostra 1 e da amostra 2, respectivamente, bem como a análise da sequência dos péptidos de cor, que correspondem aos picos que apenas figuram no cromatograma da amostra 1, revelam de que os radicais amino-ácidos Lis-107, Lis-125 e Lis-136 se situam dentro da zona do local da combinação com heparina, na antitrombina humana.

EXEMPLO 14

Procedendo da maneira referida no exemplo 13, a análise do local da combinação com hirudina, na trombina humana, pode realizar-se mediante o dispositivo descrito no exemplo 13. A trombina humana (amostra 1; 250 ug) e o complexo de hirudina-trombina [amostra 2; 750 ug; razão molar (hirudina:trombina) = (1,2 : 1)] são tratados, sucessivamente, da forma referida nos passos b) a g) do exemplo 13. A comparação dos padrões dos picos nos dois cromatogramas obtidos da amostra 1 e a amostra 2, respectivamente, bem como a análise da sequência dos péptidos de cor, que correspondem aos picos que apenas surgem no cromatograma da amostra 1, revelam de que os radicais amino-ácidos Lis-21, Lis-52, Lis-65, Lis-106, Lis-107 e Lis-154 se encontram dentro da área do local da combinação com a hirudina, na trombina humana.

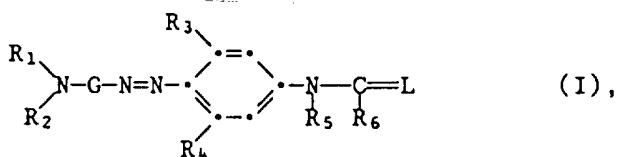
EXEMPLO 15

Procedendo de maneira análoga à referida nos exemplos 13 e 14, pode também usar-se um outro composto de fórmula I ou um dos seus sais, por ex., de acordo com os exemplo 1 a 8, como reagente para a modificação química no passo b) da sequência de tratamento realizada mediante o dispositivo descrito no exemplo 13.

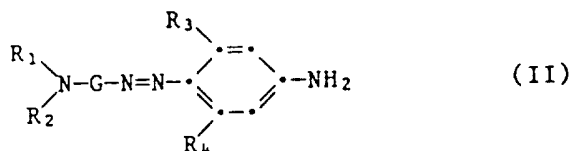
[Handwritten signature]

REIVINDICAÇÕES:

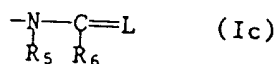
1ª. - Processo para a preparação de um composto de fórmula



em que R₁ representa alquilo inferior, R₂ representa alquilo inferior, R₃ representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R₄ representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno eventualmente substituído, ou um grupo 1,4-naftileno, eventualmente substituído, e em que R₅ e R₆, em conjunto representam uma ligação adicional e L significa um átomo de oxigénio ou de enxofre, ou em que R₅ representa hidrogénio, R₆ representa halogenometilo e L representa um átomo de oxigénio, ou de um dos seus sais, caracterizado por, num composto de fórmula



ou num dos seus sais, se converter o grupo NH_2 no grupo de fórmula



e, caso se desejar, se separar uma mistura isómera obtida nos isómeros individuais e se isolar o isómero desejado de fórmula I, se resolver uma mistura enantiómera ou diastereómera obtida nos enantiómeros ou diastereómeros individuais, e se isolar o enantiómero ou diastereómero desejado, e/ou se converter num sal um composto livre obtido, de fórmula I, ou se transformar um sal obtido no composto livre de fórmula I ou num outro sal.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto de fórmula I ou um dos seus sais, em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogênio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno, eventualmente substituído, ou um grupo 1,4-naftileno, eventualmente substituído, R_5 e R_6 em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigênio ou de enxofre.

3ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto de fórmula I ou um dos seus sais, em que R_1 representa alquilo

inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou por sulfo, e em que R_5 e R_6 , em conjunto representam uma ligação adicional, e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 representa halogenometilo e L representa um átomo de oxigénio.

4ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto de fórmula I ou um dos seus sais, em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogénio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou por sulfo, ou um grupo 1,4-naftileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou por sulfo, R_5 e R_6 em conjunto, representam uma ligação adicional, e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre.

5ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto de fórmula I ou um dos seus sais, em que R_1 representa C_1 - C_4 -alquilo, R_2 representa C_1 - C_4 -alquilo, R_3 representa hidrogénio ou sulfo, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por sulfo, e em que R_5 e R_6 , em conjunto representam uma ligação adicional ou de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 representa iodometilo e L representa um átomo de oxigénio.

6ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto de fórmula I ou um dos seus sais, em que R_1 representa C_1 - C_4 -al-

quilo, R_2 representa C_1-C_4 -alquilo, R_3 representa hidrogénio ou sulfo, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por sulfo, R_5 e R_6 , em conjunto representam uma ligação adicional e L representa um átomo de oxigénio ou de enxofre.

7ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto de fórmula I ou um dos seus sais, em que R_1 representa C_1-C_4 -alquilo, R_2 representa C_1-C_4 -alquilo, R_3 representa hidrogénio, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído, e em que R_5 e R_6 , em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de enxofre, ou em que R_5 representa hidrogénio, R_6 significa iodometilo e L representa um átomo de oxigénio.

8ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar um composto de fórmula I ou um dos seus sais em que R_1 representa C_1-C_4 , R_2 representa C_1-C_4 -alquilo, R_3 representa hidrogénio, R_4 representa sulfo, G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído, R_5 e R_6 em conjunto, representam uma ligação adicional e L representa um átomo de enxofre.

9ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfónico ou um dos seus sais.

10ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2,6-dissulfónico ou um dos seus sais.

11ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-(4'-isocianatobenzeno-2'-sulfônico) ou um dos seus sais.

12ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isocianato-azobenzeno-2-sulfônico ou um dos seus sais.

13ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isocianato-azobenzeno-2,6-dissulfônico ou um dos seus sais.

14ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftalen-1-azo-(4'-isocianatobenzeno-2'-sulfônico) ou um dos seus sais.

15ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-(N-iodoacetil)-amino-azobenzeno-2-sulfônico ou um dos seus sais.

16ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se preparar ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-(N-iodoacetil)-amino-azobenzeno-2,6-dissulfônico ou um dos seus sais.

seus componentes individuais e se isolar o isómero de fórmula II, desejado se resolver uma mistura enantiómera ou diastereómera obtida nos enantiómeros ou diastereómeros individuais e se isolar o enantiómero ou diastereómero desejado, e/ou se converter num sal um composto livre obtido, de fórmula II, ou se transformar um sal obtido no composto livre de fórmula II, ou num outro sal.

19ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por se preparar um composto de fórmula II ou um dos seus sais, em que R_1 representa alquilo inferior, R_2 representa alquilo inferior, R_3 representa hidrogênio, carboxi ou sulfo, R_4 representa carboxi ou sulfo, e G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo, ou um grupo 1,4-naftileno insubstituído ou substituído por carboxi e/ou sulfo.

20ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por se preparar um composto de fórmula II ou um dos seus sais, em que R_1 representa C_1 - C_4 -alquilo, R_2 representa C_1 - C_4 -alquilo, R_3 representa hidrogênio ou sulfo, R_4 representa sulfo e G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído ou substituído por sulfo.

21ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por se preparar um composto de fórmula II ou um dos seus sais, em que R_1 representa C_1 - C_4 -alquilo, R_2 representa C_1 - C_4 -alquilo, R_3 representa hidrogênio, R_4 representa sulfo e G representa um grupo 1,4-fenileno insubstituído.

22ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por se preparar ácido 4-amino-

-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2-sulfônico ou um dos seus sais.

23ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por se preparar ácido 4-amino-4'-(N,N-dimetilamino)-azobenzeno-2,6-dissulfônico ou um dos seus sais.

24ª. - Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por se preparar ácido 4-(N,N-dimetilamino)-naftaleno-1-azo-(4'-aminobenzeno-2'-sulfônico) ou um dos seus sais.

25ª. - Processo para a modificação química de uma proteína, caracterizado por se fazer reagir a respectiva proteína com um dos compostos de fórmula I ou um dos compostos de fórmula I ou um dos seus sais, obtidos de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 17.

26ª. - Processo para a modificação química de uma proteína, que envolve também uma coloração, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por se proceder tal como se indica na reivindicação 25.

27ª. - Processo para a modificação química dos radicais de lisina de uma proteína, caracterizado por se fazer reagir a respectiva proteína com ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfônico.

28ª. - Processo para a modificação química dos radicais de lisina de uma proteína, que envolve

uma coloração, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado por se proceder da maneira indicada na reivindicação 27.

29ª. - Processo para a modificação química dos radicais de cisteína de uma proteína, caracterizado por se fazer reagir a proteína com ácido 4'-(N,N-dimetil-amino)-4-(N-iodoacetil)-amino-azobenzó-2-sulfônico.

30ª. - Processo para a modificação química dos radicais de cisteína de uma proteína, que envolve uma coloração, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por se proceder tal como se indica na reivindicação 29.

31ª. - Processo para a investigação de uma proteína, caracterizado por se utilizar, na referida investigação, como agente auxiliar, um composto de fórmula I, ou um dos seus sais, obtível de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

32ª. - Processo para a modificação química de uma proteína, caracterizado por se utilizar, na referida modificação, como reagente, um composto de fórmula I, ou um dos seus sais, obtível de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

33ª. - Processo para a modificação química de uma proteína, de acordo com a reivindicação 31 ou 32, caracterizado por a referida modificação estar associada com coloração.

34ª. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado por se

utilizar o ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfônico.

35ª. - Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 31 a 33, caracterizado por se utilizar o ácido 4'-(N,N-dimetilamino)-4-(N-iodoacetil)-amino-azobenzeno-2-sulfônico.

36ª. - Processo para a preparação de um composto de fórmula II, obtível segundo o processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, ou de um seu sal, caracterizado por se utilizar nesse processo, como material de partida, um composto de fórmula I, ou um seu sal.

37ª. - Processo para o fabrico de um dispositivo para efectuar automaticamente a sequência que consiste na modificação química de uma proteína por meio de um composto de fórmula I que se pode obter de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17, ou de um seu sal; na eventual desnaturação da proteína quimicamente modificada e na cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) da mistura peptídica resultante do tratamento com protease, caracterizado por compreender a combinação dos seguintes componentes: uma bomba injectora que serve para fornecer uma amostra da proteína que se pretende modificar quimicamente por meio de um composto I ou de um seu sal, solventes, reagentes e/ou catalisadores necessários aos referidos passos de modificação química por meio de um composto I ou de um seu sal, da desnaturação facultativa e do tratamento com protease gás inerte e solução de lavagem, através de uma primeira ligação até um reactor componente essa que está equipada com uma tampa rosçada e está instalada dentro de uma manga de aquecimento, uma bomba de vácuo componente essa que permite através de uma segunda ligação a evacuação do referido reactor fim de concen-

trar o conteúdo do referido reactor uma terceira ligação, compente essa que através de um ligeiro excesso de pressão de gás inerte fornecido pela referida bomba injectora através da referida primeira ligação que serve para libertar o conteúdo do referido reactor uma vez efectuada a modificação química ou a desnaturação facultativa através de uma primeira válvula, de uma quarta ligação, de uma segunda válvula e uma quinta ligação para uma unidade de dessalinização, ou que serve para libertar o conteúdo do referido reactor quando se efectuou o tratamento com protease através da referida primeira válvula, da referida quarta ligação, da referida segunda válvula e de uma sexta ligação a uma componente de HPLC componente essa a que estão ligados um tracejador ("plotter") e, através de uma sétima ligação um recolher da fracções, ou que serve conduzir a solução da lavagem contida no referido reactor através da referida primeira válvula e de uma oitava ligação para um reservatório de resíduos, uma bomba componente essa que fornece eluente através de uma nona ligação a referida segunda válvula e a referida quinta ligação para a referida unidade de dessalinização, um décima ligação, componente essa que serve para conduzir o eluato que é eluído de referida unidade de dessalinização para um detector, componente esse que serve para controlar uma terceira válvula de modo que o eluato que é eluído a partir da referida unidade de dessalinização, quando contém a proteína químicamente modificada no passo de modificação química ou eventualmente a proteína químicamente modificada desnaturada preparada no passo de desnaturação facultativo, seja fornecido através de uma décima primeira ligação ao referido reactor e que, quando não contém essa proteína químicamente modificada ou essa proteína químicamente modificada desnaturada, seja conduzida através de décima segunda ligação para o referido reservatório de resíduos, e uma décima terceira ligação, componente essa que serve para conduzir o eluato do referido detector para a referida terceira válvula.



38^a. - Processo para preparar automaticamente a sequência mencionada na reivindicação 37, caracterizado por a referida proteína ser processada com o auxílio de um dispositivo fabricado de acordo com a reivindicação 17.

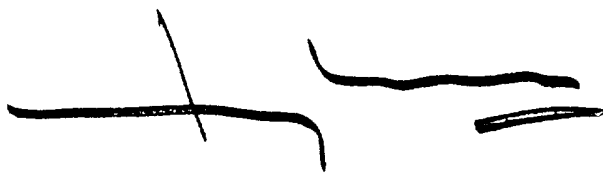
39^a. - Processo de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por, no passo de modificação química se fazer reagir a proteína com ácido 4'-(N,N-dimetil-amino)-4-isotiocianato-azobenzeno-2-sulfônico.

40^a. - Processo de acordo com a reivindicação 38, caracterizado por, no passo de modificação química se fazer reagir a proteína com ácido 4'-(N,N-dimetil-amino)-4-(N-iodoacetil)-amino-azobenzeno-2-sulfônico.

41^a. - Processo para efectuar automaticamente a sequência mencionada na reivindicação 37, caracterizado por se utilizar nesse processo um dispositivo fabricado de acordo com a reivindicação 37.

42^a. - Processo para realizar o passo de modificação química mencionado na reivindicação 37, e efectuado num dispositivo fabricado de acordo com a reivindicação 37, caracterizado por se utilizar nesse processo, como reagente, um composto obtível de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17.

Lisboa, 8 de Maio de 1989



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORCOEN, 10-A, 1.^o
1200 LISBOA

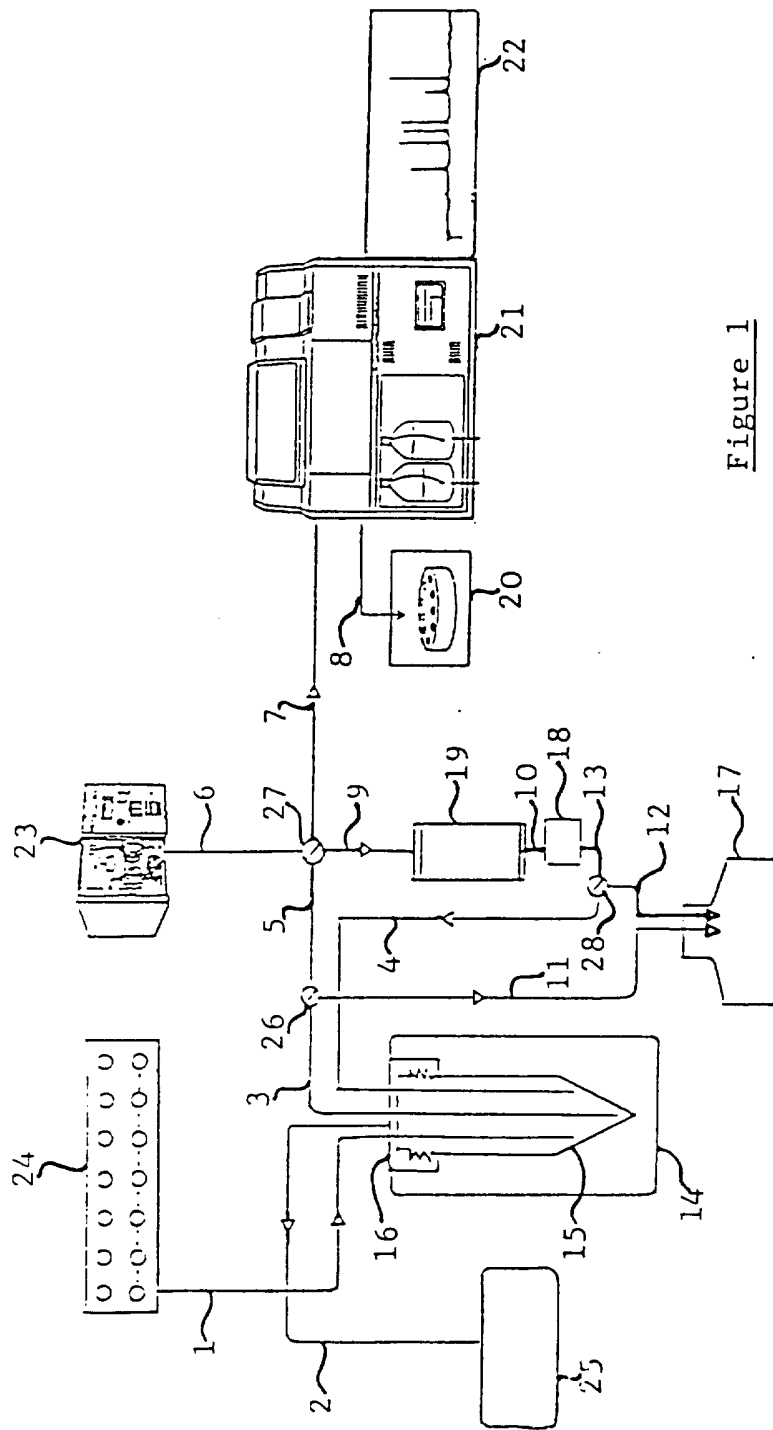


Figure 1

Handwritten signature or initials.