



(11) **Número de Publicação:** PT 559064 E

(51) **Classificação Internacional:** (Ed. 6)

C12N009/16 A C12N009/18 B
C07J009/00 B C07K001/00 B

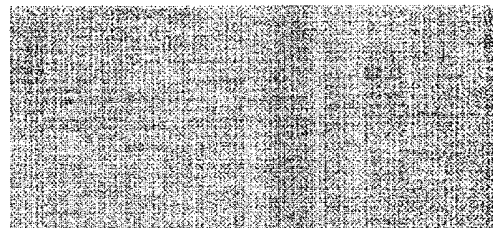
(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de depósito: 1993.02.24	(73) Titular(es): AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG - 65926 FRANKFURT AM MAIN DE
(30) Prioridade: 1992.02.29 DE 4206395	
(43) Data de publicação do pedido: 1993.09.08	(72) Inventor(es): GUNTER MULLER DE STEFAN MULLNER DE
(45) Data e BPI da concessão: 2001.05.23	(74) Mandatário(s): JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) **Epígrafe:** COMPLEXOS QUE CONTÊM GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOL-PROTEÍNAS E DERIVADOS DE ÁCIDO COLÂNICO PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO

(57) **Resumo:**

COMPLEXOS QUE CONTÊM GLICOSIL-FOSFATIDILINOSITOL-PROTEÍNAS E DERIVADOS DE ÁCIDO COLÂNICO PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO



Descrição

“Complexos que contêm glicosil-fosfatidilinositol-proteínas e derivados de ácido colânico, processo para a sua preparação e sua utilização”

Proteínas da membrana integrais, que são conservadas na camada dupla de lípidos com uma ou mais partes da cadeia de polipeptido, são na maior parte dos casos insolúveis em água e são transformadas numa forma solúvel em água apenas com utilização de agentes auxiliares da dissolução, os assim chamados detergentes, com troca da sua estrutura.

Sob a multiplicidade dos detergentes possíveis são também conhecidos derivados do ácido colânico (DE 36 23 747), com os quais se podem transformar algumas proteínas da membrana numa forma solúvel em água. Ainda se sabe que estes derivados do ácido colânico conferem uma forma solúvel em água (solubilizam) de preferência a proteína da membrana de plasma. Não se conhece até agora uma selectividade para determinadas proteínas da membrana.

Desde há algum tempo é conhecida uma classe de proteínas da membrana que estão ligadas covalentemente por intermédio de uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (G. A. M. Cross (1987) Cell 48, Pág. 179-181; M. G. Low (1987) Biochem. J. 244, 1-13). A solubilização destas proteínas da membrana, por exemplo fosfatases alcalinas na forma funcional, até agora é conseguida apenas por tratamento com proteases como tripsina ou papaína e depois da libertação por fosfolipase-C bacteriana (I. F. Thompson et al. (1987) Biochem. Biophys Res. Commun. 145, 118-125). Neste caso, obtém-se apenas a parte hidrófila das proteínas da membrana. Para ensaios estruturais e funcionais, no entanto, a forma anfipástica deve existir com a âncora da membrana intacta. Proteínas da membrana com âncora

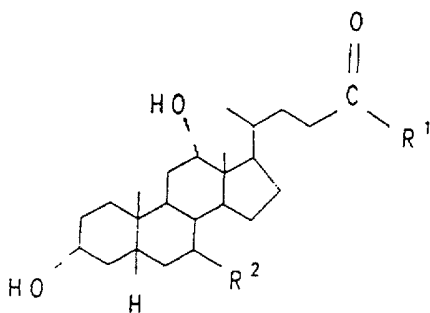
de glicosil-fosfatidilinositol (Proteínas GPI) podem solubilizar-se com detergentes correntes apenas conjuntamente com outras proteínas da membrana. Para esse efeito, muitas vezes utiliza-se também a extracção com n-butanol (A. S. Malik e M. G. Low (1986) Biochem. J. 240, pág. 519-527). Nesta forma de extracção, no entanto pode frequentemente prejudicar-se a estrutura espacial original destas proteínas da membrana. Isto mostra por exemplo uma possibilidade de obtenção diminuída da âncora da membrana GPI para a separação por fosfolipases específicas de GPI.

Descobriu-se agora que proteínas de GPI conservam a sua estrutura espacial original assim como a sua actividade e funcionalidade, se elas forem colocadas numa forma solúvel em água a partir da membrana da célula cuidadosamente com o auxílio dos derivados do ácido colânico. Os complexos solúveis em água assim obtidos podem-se separar selectivamente com fosfolipases e com elevados rendimentos numa parte da proteína de fosfoinositol-glicano e diacilglicerina. Ainda se podem separar as proteínas de glicosil-fosfatidilinositol (Proteínas GPI) com os derivados do ácido colânico de outras proteínas da membrana.

A invenção refere-se portanto a complexos solúveis em água que contêm pelo menos uma proteína de glicosil-fosfatidilinositol e pelo menos um derivado do ácido colânico.

Os complexos solúveis em água de acordo com a presente invenção têm a propriedade de, em solução aquosa, só a valores de pH neutros se formarem agregados sedimentáveis se forem submetidos a rotação numa centrífuga durante 30 minutos com mais do que 100 000 vezes a aceleração da gravidade (g).

No caso dos derivados do ácido colânico, trata-se de compostos da fórmula I



e/ou dos sais fisiologicamente aceitáveis dos compostos da fórmula I;

na qual os símbolos R^1 e R^2 têm as seguintes significações:

R^1 significa:

a) $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_3$ ou

b) $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{COOH}$,

R^2 significa:

a) $-\text{N}-\text{R}^3$ ou R^4

b) $-\text{O}-\text{R}^5$,

em que R^3 , R^4 ou R^5 são iguais ou diferentes e têm independentemente uns

dos outros a seguinte significação:

- 1) átomo de hidrogénio,
- 2) (C_1-C_5) -alquilo, de cadeia linear ou ramificada,
- 3) (C_3-C_6) -cicloalquilo,
- 4) acetilo,
- 5) acetilo, uma ou várias vezes substituído por
 - 5.1 halogéneo como flúor, cloro ou brómio,
- 6) halogéneo como flúor, cloro ou brómio,
- 7) succinilo,

8) benzoílo, uma ou várias vezes substituído por

8.1 átomo de hidrogénio,

8.2 $-\text{NO}_2$,

8.3 $-\text{N}_3$,

8.4 $-\text{NCS}$,

8.5 $-\text{NH}_2$,

8.6 $-\text{N}(\text{R}^7)_2$, em que R^7 tem a significação de b 1) a b 7) ou

8.7 halogéneo como flúor, cloro ou brómio ou

9) benzilo, uma ou mais vezes substituído pelos radicais mencionados b 8.1 a

b 8.7.

São preferidos os compostos da fórmula I,

na qual

R^1 significa $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_3$ e

R^2 significa $-\text{NHR}^4$, em que R^4 tem as seguintes significações:

a) (C_1-C_5) -alquilo,

b) benzoílo, uma ou mais vezes substituído por

1) átomo de hidrogénio,

2) NO_2 ,

3) NH_2 ou

4) halogéneo como flúor, cloro ou bromo ou

c) benzilo, uma ou várias vezes substituído pelos radicais mencionados em b 1) a b

4).

São especialmente preferidos compostos da fórmula I;

em que

R^1 significa $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_3$ e

R^2 significa $-\text{NH}-R^4$, em que R^4 tem as seguintes significações:

- a) benzoílo ou
- b) benzoílo substituído por NH_2 .

É muito especialmente preferido o ácido 4'-amino-4-benzamido-3 α -12 α -5 β -taurocólico como derivado do ácido colânico.

($R^1 = \text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3$, $R^2 = \text{H}_2\text{N}-\langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle-\text{CONH}$).

São apropriados sais fisiologicamente aceitáveis dos derivados do ácido colânico de acordo com a presente invenção por exemplo sais alcalinos, sais alcalino-terrosos ou sais de amónio, assim como sais com bases de amónio ou de trietilamina orgânicos fisiologicamente aceitáveis. Sob a designação de proteínas de glicosil-fosfatidilinositol (Proteínas GPI) entendem-se compostos que estão ancorados por intermédio da sua parte de glicosil-fosfatidilinositol numa membrana de células de microrganismos, células vegetais, células de fungos ou células de animais e possuem uma parte de proteína. Exemplos de proteínas GPI são 5'-nucleotidase, fosfatase alcalina e acetilcolina esterase.

Os derivados do ácido cólico mencionados antes podem-se preparar de acordo com processos conhecidos na literatura (DE 36 23 747).

Para a preparação do ácido 7-amino-cólico por exemplo oxida-se ácido cólico de acordo com Fieser e Rajagopalan (IACS 71, 3935) na posição 7, transforma-se em oxima de acordo com Redel et al. (Bull. Soc. Chin. Fr. 1949, p. 877) e conjuga-se com taurina de acordo com Tserng et al. (J. Lipid Res. 18, 404, 1977) e, em seguida, hidrogena-se sob pressão com catalisador de platina para a

obtenção de amina. Em seguida, faz-se o acoplamento da amina com álcool nitroarílico ou com um ácido nitrocarboxílico aromático, preferivelmente ácido 4-nitrobenzóico, com a adição de N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinolina (EEDQ) no seio de dimetilformamida (DMF) e hidrogena-se a 4-nitrobenzamida no seio de solução metanólica acidulada com ácido acético com $PtO_2 \cdot xH_2O$ como catalisador para se obter o composto de amina, de preferência o derivado do ácido 4-aminobenzóico.

A síntese dos ésteres de ácido 3- e/ou 7-hidroxi-taurocólico realiza-se de maneira análoga por reacção do correspondente composto de hidroxi com álcool nitroarílico ou um ácido nitrocarboxílico aromático, preferivelmente ácido 4-nitrobenzóico, com a adição de EEDQ em DMF. Em seguida hidrogena-se como se descreveu com catalisador de PtO_2 .

A preparação dos complexos solúveis em água de acordo com a presente invenção realiza-se por exemplo procedendo da seguinte forma

- a) isolam-se membranas que contêm proteínas GPI,
 - b) incubam-se as membranas com pelo menos um derivado do ácido colânico
- e
- c) isolam-se os complexos solúveis em água que contêm pelo menos uma proteína GPI e pelo menos um derivado de ácido colânico.

As proteínas GPI podem-se obter a partir de grande número de organismos, por exemplo de ratazanas, porcos ou bezerros. São por exemplo apropriadas membranas do plasma de adipócitos de ratazanas para a recuperação de 5'-nucleotidase ou membranas de eritrócitos de vitelos para a recuperação de acetilcolinesterase.

Na fase a) do processo procede-se convenientemente da seguinte forma: isolam-se membranas que contêm proteínas GPI isolando por exemplo adipócitos de tecido adiposo de testículos de ratas por digestão com colagénio (J. Gliemann, Diabetologia, 1967, 3, pág. 382-388). As células isoladas são desagregadas com um homogeneizador e as membranas de plasma são enriquecidas por centrifugação diferencial e, em seguida, são purificadas por centrifugação com um gradiente de sacarose (15 a 40% de sacarose) (D. W. McKeel e L. Jarret, J. Cell. Biol. 1970, 44 pág. 417-432).

Na fase b) do processo procede-se preferivelmente da seguinte forma: incubam-se as membranas com um derivado do ácido colânico por exemplo ácido 4'-amino-7 β -benzamido-3 α ,12 α ,5 β -taurocólico (BATC). A concentração dos derivados do ácido colânico monta aproximadamente a 0,01 a 0,5%, preferivelmente 0,01 a 0,2%, de maneira especialmente preferida 0,05 a 0,1%. A temperatura está compreendida entre 0°C e 40°C, preferivelmente 0°C a 15°C. O tempo de incubação varia entre 10 minutos e 2 horas, preferivelmente 15 minutos e 1 hora, e de maneira especialmente preferida entre 20 minutos e 40 minutos.

Na fase c) do processo procede-se preferivelmente da seguinte forma: centrifuga-se a mistura reaccional obtida na fase operacional b) com 35 000 a 150 000*g, preferivelmente 50 000 a 100 000*g. Pode centrifugar-se uma ou várias vezes; durante uma fase de centrifugação, a aceleração centrífuga pode manter-se constante ou variar. A aceleração centrífuga de vários processos de centrifugação pode ser igual ou diferente. O tempo de centrifugação pode variar dentro de um largo intervalo, tendo-se verificado ser favorável tempos de centrifugação de 15 minutos até 3 horas, especialmente 30 minutos a 1 hora. Os complexos solúveis em

água de acordo com a presente invenção encontram-se na fase líquida depois da operação de centrifugação. Podem-se utilizar como tal em solução ou eventualmente ser congelados ou ser purificados. Os correspondentes métodos são conhecidos por meio da literatura por exemplo:

Brodbeck, U.; Gentinetta, R.; Ott, P. (1981) em "Membrane Proteins" (Azzi A., Brodbeck U., Zahler P. eds.) Springer-Verlag, Berlim, 85-96.

Stieger, S.; Brodbeck, U. (1985), J. Neurochem. 44, 48-56;

Butikofer, P.; Kuypers, F. A.; Shanckleton, C.; Brodbeck, U.; Stieger, S. (1990), J. Biol. Chem. 265, 18983-18987.

Ott, P.; Jenny, B.; Brodbeck, U. (1975), Eur. J. Biochem 57, 469-480.

Os complexos solúveis em água assim obtidos são apropriados por exemplo no ensaio enzimático, para a determinação qualitativa ou quantitativa de substratos em sínteses químicas ou para a estabilização de sistemas de ensaio em que estão presentes relativamente proteínas GPI e para a purificação de proteínas de GPI.

A invenção refere-se ainda a um processo para a recuperação selectiva dos complexos solúveis em água de acordo com a invenção. A recuperação mencionada antes dos complexos solúveis em água caracteriza-se por uma elevada selectividade dos derivados do ácido colânico para as proteínas GPI. Outros detergentes como octilglucósido ou Triton X-100 possuem uma selectividade significativamente pior para as proteínas GPI.

As indicações das percentagens nos seguintes exemplos referem-se respectivamente a percentagem em volume, caso não se indique de outra maneira.

Exemplo 1

Complexo 5'-nucleotidase-BATC solúvel em água

a) Isolam-se adipócitos por digestão com colagénio a partir de tecido adiposo de testículos de ratazana (de acordo com J. Gliemann (1967) *Diabetologia* 3, pág. 382-388), lava-se e homogeneiza-se num homogeneizador de vidro (B. Braun, Melsungen AG, Apparatebau). Depois de centrifugação diferencial do homogeneizado (5 minutos a 1000*g e subsequentemente 20 minutos a 16 000*g), suspende-se o sólido separado da membrana de plasma resultante num tampão aquoso 25 mM de Tris/HCl (pH 7,4, 250 mM de sacarose, 1 mM de EDTA) e purifica-se por centrifugação e gradiente de sacarose (gradiente linear de 15-40% de sacarose em Tris/HCl 25 mM) (D. W. McKell e L. Jarrett (1970) *J. Cell. Biol.* 44. Pág. 417-432).

b) Incubam-se as membranas de plasma provenientes de a) com 0,1% de ácido 4'-amino-7β-benzamido-3α,12α,5β-taurocólico (BATC). O tempo de reacção é igual a 30 minutos a 4°C.

c) Centrifuga-se a mistura de incubação proveniente de b) durante 30 minutos a 150 000*g, rejeitam-se os sedimentos das membranas de plasma e o sobrenadante é em seguida centrifugado ainda mais duas vezes durante 30 minutos a 100 000*g e os resíduos sólidos sedimentados são respectivamente agitados. O sobrenadante contém o complexo 5'-nucleotidase-BATC solúvel em água.

A detecção da actividade de 5'-nucleotidase realiza-se por hidrólise de 5'-AMP radioactivo. Depois da precipitação do AMP não hidrolisado por Ba(OH)₂ 0,3 N mede-se a radioactividade da adenosina obtida no sobnadante (de acordo com E. M. Bailyes et al. (1982) *Biochem. J.* 203, pág. 245-251).

Exemplo 2

Complexo Fosfatase Alcalin-BATC Solúvel em Água

A preparação realiza-se como se descreveu no Exemplo 1 a) a 1 c).

A detecção da actividade de fosfatase alcalina realiza-se espectroscopicamente por hidrólise de fosfato p-nitrofenilo (Y. Ikehara et al. (1977) *Biochem. Biophys. Acta* 470, pág. 201-211).

Exemplo 3

Complexo de Acetilcolinesterase-BATC Solúvel em Água

Incubam-se eritrócitos de vitela (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Alemanha) quando se descreveu no Exemplo 1 b) e 1 c). Para esse efeito incubam-se 1 ml de eritrócitos de vitela secos em 1 ml de tampão (Tris/HCl, 25 mM, pH 7,4) com 0,1% de BATC (expresso em volume) durante 30 minutos a 4°C e, em seguida, centrifuga-se como no Exemplo 1 c).

A detecção da acetilcolinesterase (T. L. Rosenberry e D. M. Scoggin (1984) *J. Biol Chem.* 259, pág. 5643-5652) realiza-se mediante hidrólise de acetilcolina radioactiva. A radioactividade do ácido acético radioactivo libertado é medida depois da separação da acetilcolina radioactiva não hidrolisada por separação de fases a um valor de pH ácido.

Exemplo 4

Enriquecimento Selectivo de Proteínas GPI de Membranas de Células

Realiza-se o enriquecimento selectivo de proteínas de membrana ancoradas com GPI por BATC em comparação com os detergentes utilizados tradicionalmente bioquímica das membranas por meio do seguinte processo:

Membranas de eritrócitos de vitelo e membranas do plasma de células gordas de ratazanas (preparadas como no Exemplo 1 a) ou 3 a)) são incubadas em presença de BATC (0,1 %), octilglucósido (0,5 %) e Triton TX-100 (0,5 %). Depois da

centrifugação (30 min 100 000 x g), determinam-se as actividades enzimáticas específicas da 5'-nucleotidase, fosfatase alcalina e acetilcolinesterase, presentes no sobrenadante e calcula-se respectivamente como o factor de enriquecimento em comparação com actividade específica global na mistura de incubação solubilizada com detergente antes da centrifugação. O Quadro 1 mostra os resultados

Factor de enriquecimento

	BATC 0,1 %	Octiglicosido 0,5%	Triton X-100 0,5%
5'-Nucleotidase	4,4	1,5	1,0
Fosfatase Alcalina	3,5	1,2	0,8
Acetilcolinesterase	4,8	1,6	0,9

Exemplo 5

Separação Lipolítica da GPI-Proteína 5'-Nucleotidase

Para a demonstração da separação lipolítica eficiente da GPI-proteínas por fosfolifases bacterianas específicas de PI (fosfatidilinositol) em presença de BATC incubam-se membranas de plasma de células adiposas de ratas (Exemplo 1) com PI-PLC (Bacillus cerus, Sigma Chemie GmbH) na presença de 0,1% de BATC, 0,5 % de desoxicolato ou 0,1 % de Nonidet P-40.

A separação da ancoragem à membrana de glicosil-fosfatidilinositol da 5'-nucleotidase por (G)PI-PLC(D) de Bacillus cereus realiza-se pelo comportamento de distribuição das proteínas (identificadas pela sua actividade enzimática) entre um detergente (TX-114) e uma fase aquosa. A forma que contém ancoragem anfílica da membrana enriquece-se na fase de detergente, a forma hidrófila isenta de ancoragem da membrana concentra-se na fase aquosa.


A separação de fases com TX-114 realiza-se de acordo com C. Bordier

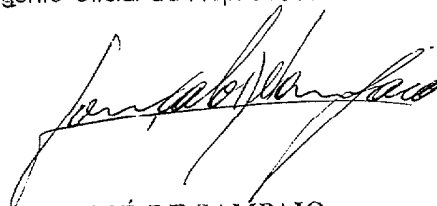
(1981) J. Biol. Chem. 256, pág. 1604-1607; J. G. Pryde e J. H. Phillips (1986) Biochem. J. 233. Pág. 525-533; B. R. Ganong e J. P. Delmore (1991) Anal. Biochem. 193, pág. 35-37 com as seguintes modificações: 50 µl de mistura de incubação são misturados com 1 ml de TX-114 (2 %), 144 mM NaCl arrefecido com gelo. A separação de fases consegue-se por aquecimento a 37°C e centrifugação (2 min a 10 000*g). A fase de detergente é re-extraída duas vezes. As fases aquosas foram reunidas. O Quadro 2 mostra os resultados.

<u>Tempo de incubação</u> (min)	<u>Detergente</u>		
	BATC 0,1 %	Nonidet P-40 0,1%	Desoxicolato 0,5%
0	27	33	6
5	55	48	8
30	112	88	11
60	256	211	19
90	578	485	45
120	732	654	109
240	1842	1489	144
480	2231	1651	162

A separação lipolítica da âncora da membrana GPI com (G)PI-PLC em presença de BATC (0,1%) realiza-se mais rapidamente e com uma nitidamente melhor eficiência em comparação com Nonidet P-40 ou deoxicolato.

Lisboa, 9 de Julho de 2001

 O Agente Oficial da Propriedade Industrial



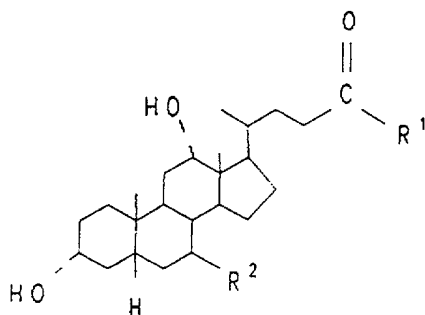
JOSÉ DE SAMPAIO

A.O.P.I.

Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1269-063 LISBOA

Reivindicações

1. Complexo solúvel em água que contém pelo menos uma glicosil-fosfatidilinositol-proteína e pelo menos um derivado do ácido colânico da fórmula I



e/ou sais fisiologicamente aceitáveis do composto da fórmula I, na qual os símbolos R^1 e R^2 têm as seguintes significações:

R^1 significa:

- a) $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_3$ ou
- b) $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{COOH}$,

R^2 significa:

- a) $\begin{array}{c} \text{R}^4 \\ | \\ -\text{N}-\text{R}^3 \end{array}$ ou
- b) $-\text{O}-\text{R}^5$,

em que R^3 , R^4 ou R^5 são iguais ou diferentes e têm, independentemente uns dos outros, a seguinte significação:

- 1) átomo de hidrogénio,
- 2) (C_1-C_5) -alquilo, de cadeia linear ou ramificada,
- 3) (C_3-C_6) -cicloalquilo,
- 4) acetilo,

5) acetilo, uma ou várias vezes substituído por

5.1 halogéneo como flúor, cloro ou brómio,

6) halogéneo como flúor, cloro ou brómio,

7) succinilo,

8) benzoílo, uma ou várias vezes substituído por

8.1 átomo de hidrogénio,

8.2 -NO₂,

8.3 -N₃,

8.4 -NCS,

8.5 -NH₂,

8.6 -N(R⁷)₂, em que R⁷ tem a significação de b 1) a b 7) ou

8.7 halogéneo como flúor, cloro ou brómio ou

9) benzilo, uma ou mais vezes substituído pelos radicais mencionados b 8.1 a

b 8.7.

2. Complexo solúvel em água de acordo com a reivindicação 1, em que

R¹ significa -NH-CH₂CH₂-SO₃ e

R² significa -NHR⁴, em que R⁴ tem as seguintes significações:

a) (C₁-C₅)-alquilo,

b) benzoílo, uma ou mais vezes substituído por

1) átomo de hidrogénio,

2) NO₂,

3) NH₂ ou

4) halogéneo como flúor, cloro ou bromo ou

c) benzilo, uma ou várias vezes substituído pelos radicais mencionados em b 1) a b 4).

3. Complexo solúvel em água de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que R^1 significa $-NH-CH_2CH_2-SO_3$ e

R^2 significa $-NH-R^4$, em que R^4 tem as seguintes significações:

a) benzoílo ou

b) benzoílo substituído por NH_2 .

4. Complexo solúvel em água de acordo com uma ou mais reivindicações 1 a 3, em que como derivado do ácido colânico está contido ácido 4'-amino-7-benzamido-3 α ,12 α ,5 β -taurocolânico.

5. Complexo solúvel em água de acordo com uma ou mais reivindicações 1 a 4, em que como glicosil-fosfatidilinositol-proteína está contida 5'-nucleotidase, fosfatase alcalina ou acetilcolinesterase.

6. Processo para a preparação de um complexo solúvel em água de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo facto de

a) se isolarem membranas que contêm glicosil-fosfatidilinositol-proteínas,

b) se incubarem as membranas com pelo menos um derivado do ácido colânico e

c) se isolar um complexo solúvel em água que contêm pelo menos uma glicosil-fosfatidilinositol-proteína e pelo menos um derivado do ácido colânico.

7. Utilização de pelo menos um complexo solúvel em água de acordo com a reivindicação 1 a 5 para utilização em ensaios enzimáticos ou sínteses químicas ou na purificação de glicosil-fosfatidilinositol-proteínas.

Lisboa, 9 de Julho de 2001

○ Agente Oficial da Propriedade Industrial



JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 195. r/c-Drt.
1269-063 LISBOA