

377132

P.- 44.066

GF-637/C

377132

Memoria descriptiva



SECCION TECNICA
CLASIFICACION
CLASE <u>C12</u> <u>A61</u>
SUBCLASE <u>K</u> <u>K</u>

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de MOCHIDA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

entidad / de nacionalidad japonesa

con domicilio en 1-1-1, Kamiya, Kita-ku, Tokyo, Japon

por: "METODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACION ESTABLE QUE CON TIENE CITOCROMO c"

(Clase Internacional A61k C12k)

27.2.70.



970

El citocromo c es una proteína que contiene hem, que existe en casi todos los animales y plantas, así como microbios, y que actúa como factor importante en la respiración de las células. Las funciones bioquímicas de esta sustancia han sido conocidas en detalle mediante estudios: como miembro de una serie de citocromos tales como citocromo a y citocromo b, el citocromo c constituye un factor vital para la regulación de la velocidad de oxidación en un mecanismo productor de energía. Por tanto, el citocromo c tiene usos clínicos en los casos de aquellas enfermedades que se supone son debidas a desórdenes respiratorios o a escasez de suministro de oxígeno a las células, tales como angina de pecho, infarto de miocardio, hemorragia cerebral, trombosis cerebral, intoxicación por drogas, envenenamiento con CO, y sus secuelas.

Así, en virtud de su acción farmacológica, se considera que el citocromo c es una de las drogas más esenciales en la práctica clínica. Su administración ha sido exclusivamente parenteral, es decir, por inyección intravenosa o intramuscular. Esta es la conclusión natural a partir del concepto tradicional de fisiología, que insiste en que el citocromo c, por ser compuesto de alto peso molecular, apenas puede ser transferido en el organismo a no ser que sea administrado parenteralmente.

Entretanto, el citocromo c, por ser una proteína extraída del corazón de los animales, o de microbios tales como levadura, es una heteroproteína para el cuerpo humano, que ocasionalmente puede desarrollar anafilaxis debido a una reacción de antígenos-anticuerpos contra ella. Por tanto, su uso exige máximas precauciones. Además, el

30
27.2.70.

377132



5 citocromo c administrado por inyección es excretado muy rápidamente. Su concentración en la sangre se reduce al 50% en 15 min tras la administración. Es sabido que la concentración eficaz de citocromo c en la sangre solo se mantiene durante corto tiempo, siendo antieconómicamente excretada del cuerpo la mayor parte del citocromo c.

10 Para eliminar este serio inconveniente del citocromo c, que restringe y perjudica mucho a su utilidad, el autor de la presente invención efectuó experimentos con animales, sobre la velocidad práctica de absorción y la eficacia del citocromo c dado por administración oral, que es más segura que la inyección. Sin embargo, se ha creído que era difícil para el cuerpo absorber citocromos administrados de esta manera.

15 Como resultado, se ha descubierto que, contrariamente a la regla fisiológica usual, el citocromo c puede ser absorbido lentamente a través de las paredes intestinales; su concentración efectiva en la sangre puede durar más que en el caso de la inyección; y su eficacia no es menor que en el caso de la inyección. La invención ha sido perfeccionada sobre la base de estos descubrimientos. Así, se ha establecido que la utilidad clínica del citocromo c puede ser reforzada por administración oral. Sin embargo, ha sido difícil llevar esto a la práctica, debido a que el citocromo c es extremadamente inestable.

30
27.2.70. Específicamente, el citocromo c pierde rápidamente su actividad cuando es expuesto al oxígeno del aire, o a la luz. Aparte de estas influencias exteriores, es una proteína de alto peso molecular, y por tanto sus-



ceptible de cambios de conformación en estado natural, lo que tiene como resultado una disminución de su actividad.

Se han elaborado diversos métodos para la estabilización de preparaciones de citocromo c.

5 En la práctica comercial actual, se añade a una solución acuosa de citocromo c un agente reductor tal como sulfito sódico o ácido ascórbico; o bien, además de esto, se le puede añadir un aminoácido, péptido, azúcar, etc, con el fin de evitar cambios de conformación. Para
10 comercializar la preparación de citocromo c antes mencionada, dicha solución ha de ser embotellada en ampollas en las que el aire está reemplazado por nitrógeno gaseoso; o bien, tras liofilización en la ampolla, el aire ha de ser reemplazado por nitrógeno. Estos métodos son esenciales
15 para la estabilización de las preparaciones a inyectar. Cuando se trata de la manufactura de medicinas internas, tales como tabletas, gránulos o supositorios, incluso la composición con estabilizadores, tales como los antes men-
20 cionados agente reductor, aminoácido, péptido y azúcar, es insuficiente para evitar que el citocromo c pierda su actividad, y por tanto no se dispone fácilmente de este producto para su uso clínico.

Por tanto, el autor de la invención emprendió el desarrollo de un procedimiento para producir una pre-
25 paración de citocromo c adecuada para administración oral, y descubrió que se puede obtener una preparación estable de citocromo c enfriando primero, o deshidratando lentamente, una mezcla coloidal acuosa de citocromo c y gelatina, para transformarla en gel, y secándola luego por
30 eliminación de agua, manteniéndola en estado de gel co-

27.2.70.



loidial. Así es innecesaria la adición de cualquier estabilizador, aparte de la gelatina.

El siguiente es un método representativo para hacer esto:

5 (a) Se añade gelatina a una solución acuosa de citocromo c. La solución resultante es calentada, para disolución, a una temperatura insuficiente para perjudicar a la actividad del citocromo c (preferiblemente de 10 40 a 50°C), es vertida en un líquido que no sea miscible con agua y no se haga muy viscoso ni se congele a bajas 15 temperaturas, tal como un aceite vegetal (por ejemplo aceite de ricino, aceite de camelia o parafina líquida), aceite mineral o alcohol hexadecílico, y la solución es enfriada con agitación. Alternativamente, la solución es 20 introducida en el líquido antes mencionado, para formar glóbulos tipo gel. Estos glóbulos tipo gel son filtrados para separarlos, y, bajo presión reducida o un aire seco, son dejados a una temperatura que asegure que se mantiene el estado de gel coloidal, para que se sequen lentamente. Así se pueden obtener gránulos globulares perfectamente solidificados. La temperatura de enfriamiento a la que se 25 han de dejar los glóbulos varía según la concentración de gelatina, pero ha de ser una que pueda asegurar la conservación del estado de gel coloidal. Preferiblemente es menor de 20°C.

El secado anterior puede ser realizado con disolventes para deshidratación tales como acetona o alcohol, pero el secado inicial ha de ser efectuado usando un disolvente que tenga una capacidad de deshidratación controlada por la adición de agua. De lo contrario solo

30
27.2.70.



se secará y solidificará la superficie granular, lo que
tiene como resultado la pérdida del estado de gel coloi-
dal. Así, es deseable efectuar la deshidratación partien-
do de un disolvente que tenga una capacidad débil de des-
5 hidratación, y cambiando gradualmente a uno que tenga una
capacidad de deshidratación más fuerte. Los gránulos glo-
bulares antes mencionados pueden ser llevado hasta el diá-
metro deseado por elección apropiada de la concentración
de gelatina, del método de agitación, del método de in-
10 troducción, del tipo de líquido inmiscible con el agua, y
de la temperatura.

(b) La mezcla antes mencionada, de gelatina y
una solución acuosa de citocromo c, es extendida en capa
delgada y vertida en un molde, donde es enfriada hasta
15 formar un gel, y se la deja secar al aire a una tempera-
tura relativamente baja, a la que conserve su estado de
gel coloidal, preferiblemente a menos de 20°C, o es des-
hidratada lentamente en un gas seco. La sustancia sólida
seca resultante es machacada hasta el tamaño deseado, pa-
20 ra producir los gránulos.

El objeto de la presente invención puede ser
alcanzado tanto por el método (a) como por el método (b).
El método (a) tiene la ventaja de que puede producir fá-
cilmente gránulos globulares uniformes, y de que se puede
25 aplicar fácilmente a dichos gránulos un recubrimiento en-
térico.

Para administración oral, los gránulos así ob-
tenidos pueden ser empleados como preparación granular
con revestimiento entérico para evitar la descomposición
30 del citocromo c por ácidos gástricos y pepsinas. Alterna-

27.2.70.



tivamente, pueden ser moldeados a presión en forma de tabletas comunes, a las que se puede añadir un excipiente, o pueden ser manufacturados como supositorios, suspendiendo los gránulos, sin el revestimiento entérico, en una base para supositorios tal como aceite endurecido fundido, manteca de cacao o polietilenglicol, y vertiendo la suspensión en un molde.

Las preparaciones de citocromo c así manufacturadas se usan como medicinas internas en forma de gránulos, o de tabletas, o como supositorios, En comparación con las preparaciones que se inyectan, es menos probable que induzcan anafilaxis.

Las preparaciones estables de citocromo c producidas por el método de la presente invención están muy perfeccionadas frente a las preparaciones usuales, y son extremadamente útiles tanto desde el punto de vista médico como del farmacéutico.

El mecanismo estabilizador del citocromo c, de la presente invención, no se entiende aún del todo, pero se supone que es como sigue: la mezcla gelificada de la solución acuosa de citocromo c con gelatina es deshidratada mientras es mantenida en estado de gel coloidal. Las moléculas de citocromo c son mantenidas así en estado difundido en el gel de gelatina. Por tanto, no están expuestas directamente a efectos exteriores tales como oxígeno o luz, y están eficazmente protegidas de ellos, de manera que la molécula de citocromo c puede presentar fuerte resistencia a la pérdida de actividad.

Así, en el método de la presente invención, la condición indispensable para estabilizar el citocromo c

30
27.2.70.



es secar la mezcla de gelatina y solución acuosa de citocromo c, por eliminación de agua mientras se mantiene la mezcla en estado de gel coloidal. Por los siguientes hechos es evidente que esto es factible.

5

En la producción del citocromo c liofilizado antes mencionado, para inyección, se añadió gelatina a la solución acuosa de citocromo c antes de la liofilización, con el fin de evitar el encogimiento del producto liofilizado y mejorar así su valor comercial. Se descubrió entonces que la gelatina bajo liofilización, como se muestra más adelante en la tabla 1, no contribuía a la estabilización del citocromo c. Este hecho puede ser verificado por el hecho de que cuando la ampolla que contiene citocromo c está soldada de forma imperfecta, el aire y humedad que se infiltran descoloran el citocromo c, y su actividad se reduce nítidamente. Por tanto, en el caso del producto usual liofilizado con gelatina es esencial que el estabilizador antes mencionado entre en la composición, y que el producto esté perfectamente aislado de influencias del exterior, por cierre hermético de la ampolla u otro recipiente. También es deseable que al aire de la ampolla esté reemplazado por un gas inerte tal como nitrógeno.

10

15

20

25

En contraste con esto, es particularmente digno de mención el que el efecto de estabilización del citocromo c es muy sustancial en la invención, la cual, aunque usa la misma gelatina, no requiere composición con otros estabilizadores ni cierre hermético del recipiente.

En la tabla 1 se relacionan los resultados de liofilizar una solución de citocromo c purificada de corazón de caballo, mostrando la estabilidad relativa del ci-

30
27.2.70.



5 trocromo c en los casos de citocromo c solo, citocromo c
al que se ha añadido gelatina, y citocromo c al que se ha
añadido gelatina y sulfito sódico. Se vertió en ampollas
1 ml de las soluciones acuosas que se indican en la ta-
5 bla 1. Tras liofilizar, las ampollas fueron cerradas her-
méticamente y conservadas en un ambiente controlado ter-
mostáticamente a 45°C. Después se comprobó el cambio de
actividad. La actividad se midió mediante el manómetro de
Warburg. Se añadieron muestras a un sistema de ácido as-
10 córbito y citocromo oxidasa, para determinar el consumo
de oxígeno. Las cifras de los datos de ensayo representan
la actividad residual en %, calculada a partir del consu-
mo de oxígeno por el citocromo c.

27.2.70.

27.2.70.

Tabla 1

	Período					
	Aire no reemplazado por nitrógeno			Aire reemplazado por nitrógeno		
	1 semana	10 semanas	30 semanas	1 semana	10 semanas	30 semanas
Muestras						
Citocromo c, 15 mg	85	66	58	88	70	64
Citocromo c, 15 mg Gelatina, 5 mg	81	67	56	88	72	65
Citocromo c, 15 mg Gelatina, 50 mg	88	69	60	90	73	68
Citocromo c, 15 mg Sulfito sódico ácido, 1 mg	96	92	87	98	93	91
Citocromo c, 15 mg Sulfito sódico ácido, 1 mg + Gelatina, 5 mg	96	90	85	97	92	89





Estos resultados muestran que, en el producto liofilizado, la gelatina no contribuye a la estabilización del citocromo c. Esta falta de contribución de la gelatina a la estabilización del citocromo c, en la liofilización, parece ser atribuible a la pérdida de relación de coexistencia entre el citocromo c y gelatina, en estado de gel, bajo liofilización.

Como se ha mencionado antes, la presente invención se basa en el conocimiento de que el citocromo c puede ser absorbido gradualmente, con una duración de su concentración eficaz en la sangre mayor que en el caso de la inyección, y la eficacia no es menor que cuando se inyecta. Dado que este conocimiento es clave vital para el entendimiento de la invención, se hará una explicación más elaborada, haciendo referencia al diagrama adjunto.

Las curvas del diagrama adjunto muestran el valor medio de cinco medidas del cambio de concentración de citocromo c en el suero, cuando se introdujeron 20 mg de una solución de citocromo c de corazón de caballo en la vena y en el duodeno de una rata que pesaba aproximadamente 200 g. Las abscisas son el tiempo pasado tras la administración, y las ordenadas son la cantidad de citocromo c (μg) detectada en 1 ml de suero. Con administración intravenosa (línea de puntos), el valor tras 1 hora de administración es $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, y el citocromo c desaparece completamente en 6 horas, de manera que la duración de una concentración eficaz en la sangre es corta. Con administración oral en el duodeno (línea continua) la concentración permanece por encima de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ durante 3 horas, y existe algo de citocromo c en el caudal de sangre incluso

30
27.2.70.



5 tras 6 horas. Estos resultados experimentales prueban que el citocromo c puede pasar a través de las paredes del canal intestinal, y entrar en el caudal de sangre, y también que, dado que tal paso es relativamente lento, se puede mantener durante un período de tiempo relativamente largo una concentración eficaz del citocromo c en la sangre.

10 El análisis cuantitativo de la concentración de citocromo c empleado en el presente experimento es un método nuevo elaborado por el autor de la invención, para medir cantidades de traza de citocromo c en el suero, y se caracteriza por una sensibilidad de 100 a 1000 veces mayor que la de la medida usual de actividad de respiración o medida del espectro de absorción, de manera que es capaz de detectar una cantidad de traza, tan baja como 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de citocromo c.

15 El nuevo método es como sigue: el citocromo c es absorbido en eritrocitos tratados con formalina y ácido tánico, para producir glóbulos rojos de sangre sensibilizados. Estos glóbulos rojos de sangre sensibilizados pueden reaccionar con el anticuerpo del citocromo c, e iniciar la aglutinación. Sin embargo, cuando hay más de 20 0,05 μg de citocromo c libre presentes en este sistema de reacción, se inhibe la hemoaglutinación. Así, produciendo reacciones simultáneas en la serie diluída de muestras, y en la serie diluída normalizada de citocromo c, y comparando el grado de inhibición de la aglutinación, se puede determinar la cantidad de citocromo c en la muestra.

25 En la práctica real, la cromatografía del suero ensayado se efectuó usando el tipo amónico de Amberlite IRC-50 (marca registrada de una resina sintética produ-
30
27.2.70.



5 cida por Rohm & Haas Co.). El citocromo c fue separado del suero, y el componente de bajo peso molecular fue separado por diálisis. Luego se efectuó el análisis cuantitativo utilizando dicha reacción de inhibición de la hemoaglutinación.

10 Como es bien sabido, los métodos inmunológicos, tal como se ilustran por la determinación del tipo de sangre o la identificación de cepas de virus, se caracterizan por una especificidad extremadamente grande. Hay muchas variaciones de este método, de entre las cuales se puede elegir un método apropiado que cumpla un fin dado. El método de reacción de inhibición de la hemoaglutinación, antes mencionado, es notablemente sensible, entre las diferentes variaciones de dicho método inmunológico, y es un método excelente para el análisis cuantitativo de trazas de hormona proteica en el fluido corpóreo, por ejemplo gonadotropina u hormona del crecimiento.

20 El autor de la invención, aunque utilizó este método sensible y específico, en vista del hecho de que el citocromo c es una proteína fuertemente básica, adoptó el procedimiento de extraer selectivamente y refinar el citocromo c, del suero ensayado, por cromatografía. Por tanto, los resultados de este análisis cuantitativo son muy exactos y reproducibles, mostrando exactamente el cambio de concentración del citocromo c administrado en la sangre.

25 Los anteriores resultados experimentales son amplia evidencia del hecho de que la eficacia del citocromo c administrado oralmente es tan buena como por inyección.

30
27.2.70.

377132



Esto se demostrará más concretamente por el siguiente ensayo de efecto en aumento sobre leucocitos.

Es ampliamente sabido que la inyección intravenosa de citocromo c es eficaz para restablecer a un paciente de los frecuentes casos de leucopenia causados por administración de drogas antitumor tales como Tespamin (marca registrada de un producto de Sumitomo Chemical Industries Co.) o Mitomycin C. En la tabla 2 se resumen los resultados de experimentos en los que se administraron 35 mg de citocromo c por kg de peso del cuerpo, por día, a conejos leucopénicos producidos experimentalmente por administración de Tespamin. La recuperación del número de leucocitos fue comparada luego con el número de leucocitos de un grupo de conejos de control. En este experimento se administraron oralmente a los conejos gránulos de citocromo c producido por el método de la invención a partir de un músculo de corazón de caballo, con un revestimiento entérico.

Tabla 2

	Días de administración	0	5	8	12	15
Número de leucocitos	Gránulos con revestimiento entérico administrados	1590	2960	3460	5460	6400
	Grupo de control	1760	2970	2900	2860	4690

Las cifras de la tabla son valores medios para 6 animales de cada grupo.

Aunque los animales del grupo de control se recuperaron naturalmente, con un aumento reconocido del

30
27.2.70



número de leucocitos, la recuperación en el grupo de ensayo, al que se administraron gránulos con revestimiento entérico del citocromo c de la invención, fue más rápida, poniendo así en evidencia la promoción de la producción de leucocitos por el citocromo c. Si el procedimiento de recuperación es tratado como dos grupos de vectores de muestra tridimensionales, en la misma serie de tiempo, y sus vectores medios de población son comparados estadísticamente, se puede reconocer entre los dos una significación a un nivel menor del 5%.

Por otra parte, la comparación en ejemplos clínicos prácticos, entre el citocromo c según la presente invención y el citocromo c inyectado, ha revelado que el citocromo c según la presente invención no es menos eficaz que el citocromo c inyectado. Además, entre numerosos ejemplos clínicos, cuando se usa el citocromo según la invención no se han señalado casos de anafilaxis, tal como se han observado cuando se usan las inyecciones. Así, por la presente invención se puede eliminar un serio inconveniente de la inyección de citocromo c.

A continuación se presentan algunos ejemplos de aplicación de la presente invención.

Ejemplo 1

Se disolvieron en 370 ml de agua destilada 25 g de citocromo c purificado de músculo del corazón de caballo, y se añadieron 75 g de gelatina a la solución resultante, que luego fue calentada a aproximadamente 40°C, con agitación ocasional, y se disolvió gradualmente. Se llenó con 1200 ml de aceite de ricino un cilindro graduado que tenía una capacidad de 1500 ml. La capa su-

30
27.2.70.

377132



perior de aceite de ricino en el cilindro fue calentada a de 20 a 30°C, mientras la capa inferior fue mantenida a 5°C o sus proximidades, por enfriamiento exterior con hielo u otros medios. Después, la mezcla de gelatina y citocromo c fue añadida lentamente a la capa superior de aceite de ricino del cilindro, con agitación. La mezcla de gelatina y citocromo c de la parte superior del cilindro se dispersó en partículas globulares, que fueron enfriadas mientras caían y sedimentaban en el fondo en forma de gránulos gelificados. Después se eliminó por decantación la mayor parte del aceite de ricino, y el agua fue volatilizada a menos de 20°C, bajo presión de 1 mm Hg, mientras se agitaba suavemente. Tras eliminar la mayor parte de agua, los gránulos fueron recogidos, lavados tres veces con acetona, para eliminar el aceite de ricino, y secados completamente en un desecador de pentóxido de fósforo.

Ejemplo 2

Se disolvieron en 200 ml de agua destilada 10 g de citocromo c purificado de *Candida utilis*, una cepa de levadura. Se añadieron 50 g de gelatina a la solución resultante, que luego fue calentada a 40°C con agitación ocasional, para promover la disolución gradual. Inmediatamente después de completada la disolución, la solución fue vertida en una tina de 100 mm x 300 mm, que tenía 10 mm de profundidad, y se dejó enfriar.

Tras la gelificación total, el producto fue secado en un secador a baja temperatura, a aproximadamente 20°C, y, una vez seco, fue machacado hasta el tamaño de grano deseado.

27.2.70.



Los siguientes resultados de ensayo muestran la estabilidad de preparaciones de citocromo c según la invención.

5 La muestra de la tabla 3 consiste en gránulos globulares obtenidos por el procedimiento del ejemplo 1, y las muestras de las tablas 4 y 5 son tabletas de gránulos obtenidos por los procedimientos de los ejemplos 1 y 2, respectivamente, a los que luego se dio forma de tabletas con lactosa como excipiente, de manera usual.

10 Las tablas dan el tanto por ciento de actividad residual, medido de la misma manera que en la tabla 1.

Tabla 3

Muestra	Periodo de almacenamiento a 45°C		
	1 semana	10 semanas	30 semanas
Gránulos de la invención	98	92	91

Tabla 4

Muestra	Periodo de almacenamiento a 45°C		
	1 semana	10 semanas	30 semanas
Tabletas de la invención	97	93	89

27.2.70.

377 132

27.2.70.

Tabla 5

Muestra	Periodo de almacenamiento a 45°C				
	4 semanas	7 semanas	12 semanas	24 semanas	41 semanas
Tabletas de la invención	96	95	96	94	89

4



377 132



5 Como es evidente por las tablas 3 a 5, las preparaciones de citocromo c según la presente invención, a pesar del hecho de que no se usa el estabilizador que es indispensable para las preparaciones usuales de citocromo c, puede conservar su actividad durante un período muy largo de almacenamiento a 45°C. Cuando esta estabilidad se pone en contraste con la de preparaciones lipobilizadas usuales adecuadas para inyección, como se expone en la tabla 1, se ve que las preparaciones según la invención son equivalentes a las preparaciones usuales para inyección a las que se han añadido estabilizadores, y en cuyas ampollas el aire ha sido reemplazado por nitrógeno. Entretanto, como lo indican las curvas del dibujo adjunto, las preparaciones de citocromo c según la invención pueden mantener su concentración en la sangre durante muchas horas, a un nivel sustancial.

15 La presente solicitud que corresponde a la presentada en el Japón, el 5 de Marzo de 1.969, bajo el número Sho 44-16266, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

24
27.2.70.

377132



5 1.- Método para producir una preparación estable que contiene citocromo c, que comprende la operación de gelificar una mezcla de gelatina y una solución acuosa de citocromo c, y secar el gel resultante, mientras se mantiene el citocromo c en estado de gel coloidal.

10 2.- Método según la reivindicación 1, que comprende la operación de dar a dicha mezcla forma de glóbulos, antes de secar por calentamiento de dicha mezcla a una temperatura mayor que la temperatura ambiente, pero insuficiente para perjudicar la actividad del citocromo c, y de introducirla en un líquido que sea inmiscible con el agua.

15 3.- Método según la reivindicación 2, donde dicho líquido inmiscible está más frío que dicha mezcla, y dicha mezcla es introducida en él en forma de gotas.

4.- Método según la reivindicación 2, donde dicho líquido inmiscible es enfriado tras haber sido introducida dicha mezcla en él.

20 5.- Método según la reivindicación 2, donde dichos glóbulos son retirados de dicho líquido inmiscible, y luego son secados en un disolvente deshidratador.

6.- Método para producir una preparación estable que contiene citocromo c.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

27.2.70.

377132



Esta Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

4 MAR. 1971

Madrid,

P. A.

Antonio Leizaduru
for Paces

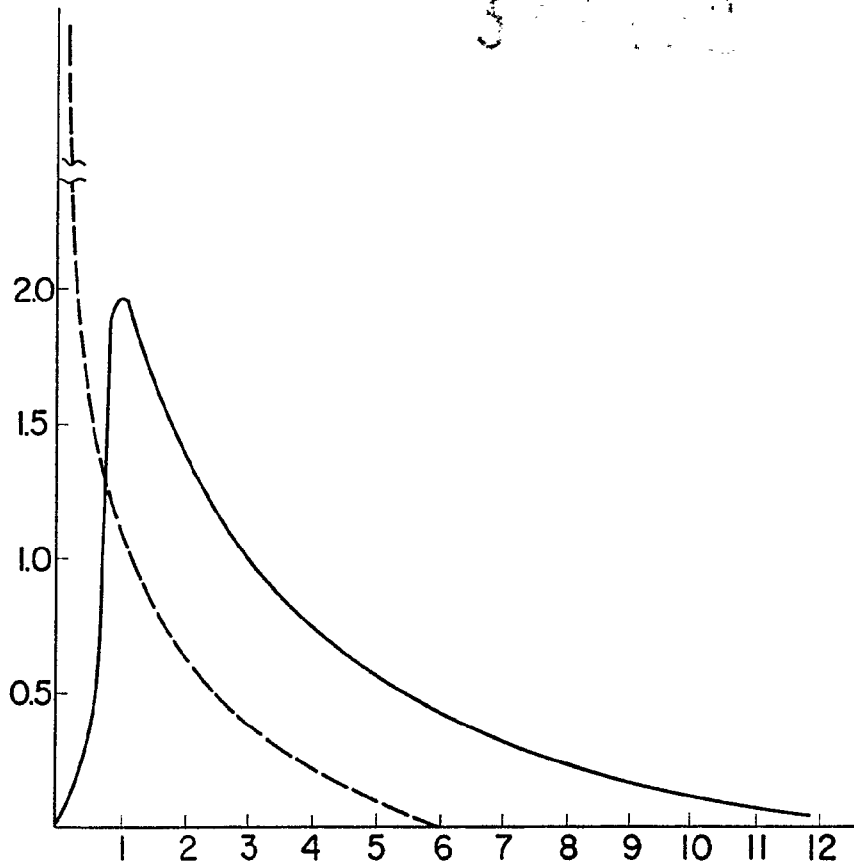
G.D.S.
27.2.70.

377132

377132



377132



Per