

405388

PATENTE DE INVENCION

405388

PLC.177 (P.C.5380)/I.

Int. Cl.: A61K



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA
DE ANTIGENO DE AUSTRALIA EN UNA MUESTRA DE SANGRE.

Solicitante PFIZER CORPORATION, entidad panameña, residente en
Calle 15 $\frac{1}{2}$, Avenida Santa Isabel, Colon, República del
Panamá.

La invención se relaciona con la preparación de reactivos para el diagnóstico de la presencia de antígeno asociado con la hepatitis, conocido también como antígeno de hepatitis B o antígeno de Australia, o para diagnosticar la presencia del anticuerpo del mismo, en muestras san

5.



guíneas. En particular, la invención se relaciona con reactivos de diagnóstico los cuales permiten unos ensayos rápidos y seguros en relación con este antígeno o su anticuerpo, y se relaciona también con los métodos de ensayo mismos y envases para realizar dichos ensayos.

5. El antígeno de Australia descubierto por Blumberg et al, J.Amer.Med.Assoc., 191, 541 (1965); Ann.Int.Med., 66, 924 (1967), está presente en la sangre de una proporción

10. muy pequeña de la población, pero su detección por medios rápidos y seguros es de una grandísima importancia al objeto de evitar el empleo para los fines de transfusión de sangre que contiene el antígeno, el cual puede dar lugar a la denominada hepatitis del suero en el recipiente. Dicha hepatitis, la cual se puede desarrollar después de un largo periodo de incubación, puede ser peligrosa e incluso fatal en

15. algunos casos. Igualmente, es importante la posibilidad de detectar el anticuerpo del antígeno de Australia en personas o animales que pueden haber sido infectados o inmunizados con antígeno de Australia.

20. Por lo tanto, existe una necesidad de encontrar unos métodos de ensayo de diagnóstico que sean rápidos, sensibles, capaces de una repetición de rutina sobre un gran número de muestras sanguíneas, que utilicen una cantidad mínima de reactivo de diagnóstico y que sean seguros, es

25. decir, capaces de detectar el antígeno (o su anticuerpo) en cualquier muestra de sangre (bien en la sangre total, en el suero o en el plasma) que lo contiene y que proporcione al mismo tiempo un número mínimo de resultados "falsos positivos" es decir, indicaciones falsas de la presencia del antígeno (o anticuerpo).

30.



- De acuerdo con la invención, un reactivo de diagnóstico para el antígeno de Australia, o el anticuerpo del mismo, comprende una suspensión acuosa de partículas de resina sintética, finamente divididas, de una forma y tamaño sustancialmente uniforme, revestidas con el anticuerpo específico al antígeno de Australia. Preferiblemente, las partículas son partículas esféricas de poliestireno que tienen un diámetro de 0,16 micras aproximadamente, pudiendo ser adecuadas también las partículas de poliestireno u otras resinas sintéticas, por ejemplo, resinas acrílicas, que tienen dimensiones uniformes de 0,06 a 0,4 micras.
5. 10.

- El anticuerpo específico al antígeno de Australia se deriva preferiblemente del suero obtenido de mamíferos, por ejemplo, humanos, ovejas, cabras o cobayos, que contienen el anticuerpo o que han sido inmunizados con antígeno de Australia altamente purificado procedente de sangre humana. El anti-suero es purificado para separar del mismo los anticuerpos residuales a las proteínas del suero humano, u otras sustancias que interferirían con el empleo del reactivo de diagnóstico para la detección del antígeno de Australia.
15. 20.

- La suspensión acuosa contiene preferiblemente 0,5 % p/v, aproximadamente, de partículas de resina, pero podría contener de 0,1 a 3 % p/v de partículas de resinas. Para la preparación del reactivo de diagnóstico, la suspensión contiene preferiblemente 0,05 % p/v aproximadamente del anticuerpo, adsorbido sobre las partículas de resina, pero esto puede variarse también en función de la concentración de partículas. La proporción de anticuerpo deberá ser justamente la suficiente para evitar la auto-agrega-
25. 30.



- ción de las partículas de resina. Para las partículas esféricas de poliestireno de 0,16 micras de diámetro, esta proporción es de 1/10 aproximadamente del peso de las partículas. Una proporción inferior a 1/20 del peso de partículas de 0,16 micras causa, como se ha encontrado, la auto-agregación. Las proporciones superiores a 1/10 conducen a una sensibilidad disminuida del reactivo de diagnóstico cuando se utiliza para ensayar la presencia de antígeno, aunque pueden utilizarse proporciones de hasta el doble del peso de partículas de resina de 0,16 micras.
- 5.
- 10.

- La suspensión contiene preferiblemente un estabilizador, añadido después de la adsorción del anticuerpo sobre las partículas, por ejemplo, una proteína inerte tal como albúmina de suero en una concentración de, por ejemplo, 0,1 % p/v. Puede estar también presente un preservativo, por ejemplo, azida sódica en una concentración de 0,1 % p/v.
- 15.

- De acuerdo con una versión preferida de la invención, el reactivo de diagnóstico contiene también suero normal (es decir, suero que no contiene el anticuerpo específico al antígeno de Australia o que no contiene el antígeno de Australia mismo) obtenido a partir de la misma especie de mamífero de la que se obtuvo el suero que contiene el anticuerpo. La presencia de dicho suero normal reduce sustancialmente la proporción de indicaciones "positivas falsas" cuando el reactivo de diagnóstico se utiliza para detectar el antígeno de Australia en muestras sanguíneas. Con preferencia, se incluye una parte aproximadamente de suero normal por 20 - 50, por ejemplo, 35 partes (en volumen) de la suspensión acuosa de partículas de resina revestidas con anticuerpo.
- 20.
- 25.
- 30.



- El reactivo de diagnóstico para el antígeno de Australia o anticuerpo, de acuerdo con la invención, puede prepararse añadiendo una suspensión de las partículas de resina, adecuadamente diluidas y filtradas si es necesario,
5. a una solución o suspensión apropiadamente diluida del anticuerpo purificado y agitando, por ejemplo, a temperatura ambiente, hasta completarse la adsorción del anticuerpo sobre las partículas. A continuación, pueden añadirse, en proporciones adecuadas, albúmina de suero, suero normal procedente de la especie de mamífero a partir de la cual se obtuvo
10. el anticuerpo, diluido si es necesario, para facilitar la manipulación. Es particularmente importante la adición de la suspensión de partículas de resina a la solución o suspensión de anticuerpo, en lugar del procedimiento inverso,
15. puesto que este último puede provocar una auto-agregación irreversible de las partículas de resina.

- En el método de ensayo, según la invención, en relación con la presencia de antígeno de Australia, se mezcla una muestra de ensayo, de suero, plasma o sangre total, opcionalmente en mezcla con un diluyente acuoso, con un volumen adecuado (por ejemplo, un volumen igual) del reactivo de diagnóstico preparado según la invención, y se continúa el
20. mezclado durante al menos 2 minutos, con preferencia durante un periodo de 5 a 10 minutos. Si el antígeno de Australia está presente en la muestra de ensayo, entonces se presenta la aglutinación de las partículas de resina, por ejemplo poliestireno, para formar aglomerados visibles. Si no
25. aparecen aglomerados en un periodo de 5 minutos, esto es indicativo de la ausencia de antígeno de Australia en la muestra de ensayo.
- 30.

En el método de ensayo según la invención para determinar la presencia de anticuerpo al antígeno de Australia, la muestra de ensayo se agita con un volumen standard de solución o suspensión purificada de antígeno de Australia derivado del plasma sanguíneo humano, se añade el reactivo de diagnóstico preparado de acuerdo con la invención y la muestra se agita durante un periodo similar. Si se observa una aglutinación de las partículas de resina, esto es indicativo de la ausencia de anticuerpo de la muestra de ensayo; si las partículas de resina se aglutinan en un periodo de 5 minutos, esto quiere decir que está presente el anticuerpo en la muestra de ensayo, ya que dicho anticuerpo ha reaccionado con el antígeno añadido y de este modo se inhibe la ulterior aglutinación de las partículas de resina por el antígeno.

Como antes se ha mencionado, se incluye preferiblemente en el reactivo de diagnóstico, suero normal procedente de la misma especie mamífera a partir de la cual se obtuvo el anticuerpo. Esto es particularmente importante para realizar el ensayo en relación con el antígeno, para reducir al mínimo la aparición de reacciones "positivas falsas". Por ejemplo, si no se incluye suero normal de cobayo en el reactivo de diagnóstico que contiene el anticuerpo derivado del antisuero de cobayo, se encontrará que un 10 % del suero humano que no contiene antígeno de Australia aglutina a las partículas de resina que tienen el anticuerpo del antígeno de Australia adsorbido sobre las mismas. Esto es probable debido a la presencia de sustancias en dicho suero humano, que reaccionan con otros materiales procedentes del antisuero del cobayo a partir del cual se obtuvo el



5. anticuerpo del antígeno de Australia. Sin embargo, si el suero normal del cobayo se incluye solamente en una cantidad comprendida entre 1 y 3 % de suero humano, se observará la aglutinación de las partículas de resina en ausencia de antígeno de Australia procedente del suero. Esto puede ser debido a los componentes del suero normal del cobayo que son capaces de reaccionar con aquellas sustancias del suero humano y evitar así que las mismas provoquen la aglutinación de las partículas de resina.
10. Para conseguir la misma finalidad, el suero normal puede ponerse en contacto con la muestra de ensayo de diversos modos diferentes a la inclusión del mismo en el reactivo de diagnóstico. Por ejemplo, el suero normal puede mezclarse con la muestra de ensayo antes de que el reactivo
15. de diagnóstico se mezcle con la muestra de ensayo; o la muestra de ensayo puede agitarse con un agitador que ha sido revestido con los sólidos procedentes del suero normal, por ejemplo, sumergiéndolo en el suero normal y evaporándolo hasta sequedad; o la muestra de ensayo puede colocarse
20. sobre una superficie que ha sido similarmente revestida con los sólidos procedentes del suero normal, por ejemplo, la superficie de un portaobjetos de cristal o de plástico.
25. En el caso de que la muestra de ensayo consista en sangre total, ésta deberá tratarse primeramente para provocar la lisis de las células de la misma y evitar así la coagulación, antes de que se ensaye con respecto a la presencia del antígeno de Australia o de su anticuerpo. Para esta finalidad, la muestra de ensayo puede tratarse con un diluyente acuoso que contiene un surfactante no iónico del
30. tipo de alquilfenol polioxietilado, por ejemplo, iso-octil-

405388

- 8 -



19 NOV. 1974

fenoxi-polioxi-etil-álcool (Triton X-100, Rohm & Haas Co.)
y citrato sódico.

5. En el caso de que la muestra de ensayo sea de plasma sanguíneo, éste deberá contener un anticoagulante, por ejemplo cualquiera de los anticoagulantes convencionales, tal como citrato sódico y convenientemente deberá tratarse también con el mismo diluyente acuoso que contiene un surfactante no iónico, al igual que para la muestra de sangre total, con el fin de proporcionar la lisis de las células residuales presentes en la misma.

10. Un envase adecuado, para la realización de los ensayos de acuerdo con la invención para detectar el antígeno de Australia, comprende preferiblemente un vial de reactivo que contiene una cantidad apropiada de un reactivo de diagnóstico de acuerdo con la invención, y un vial de reactivo que contiene una cantidad similar de una solución diluyente que contiene un agente de lisis junto con un anticoagulante, para la lisis y dilución de las muestras de ensayo de sangre total y de plasma. También pueden incluirse potaobjetos negros de cristal o de plástico sobre los cuales se llevan a cabo los ensayos.

15. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención.

20. A. Preparación de los reactivos de diagnóstico

25. EJEMPLO 1

30. Una suspensión acuosa al 40 % p/v de esferas de poliestireno de 0,16 micras, fabricadas por Styrene Products Limited (No. de producto 24.016) y vendidas por BIH Chemicals Limited, se diluye al 5 % p/v con salina tamponada con borato y se filtra a través de una membrana con un



- tamaño de poro de 1,2 micras. A continuación, se añade inmediatamente a 9 volúmenes de antisuero purificado de cobayo que contiene el anticuerpo del antígeno de Australia (diluido a 0,05 % p/v y se agita constantemente durante 30 minutos. Se añade entonces un volumen de albúmina de suero bovino (1 % p/v) y finalmente se añade azida sódica para dar una concentración de 0,1 % p/v en el producto final. El producto se mantiene a 4°C, en cuya temperatura es estable durante 3 meses por lo menos.
- 5.
10. EJEMPLO 2
- Una suspensión al 40 % p/v de las mismas esferas de poliestireno empleadas en el ejemplo 1, se diluye a un 5 % con salina tamponada con glicina y se esteriliza por la adición de beta-propiolactona bajo control del pH. A continuación, se añade a 9 volúmenes de suero purificado del cobayo, adecuadamente diluido, de los animales inmunizados con antígeno de Australia. La suspensión de poliestireno se añade lentamente, con agitación, y se continúa la agitación durante 30 minutos. Las esferas de poliestireno se centrifugan, se lavan una vez sobre el centrifugado con salina tamponada y se resuspenden al volumen original en salina tamponada. Se añade albúmina de suero bovino (1 % p/v) para estabilizar la suspensión de esferas de poliestireno y se continúa la agitación durante 30 minutos. Se añade un décimo de un volumen de suero normal diluido, de cobayos no inmunizados (diluido 1:3,5 con salina tamponada con glicina) y la mezcla se agita de nuevo durante 30 minutos. Finalmente, la mezcla se sacude vigorosamente para dispersar cualesquiera aglomeraciones de partículas. Todas las soluciones utilizadas son esterilizadas por filtración y contienen 0,1 % de
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

405388

- 10 -



azida sódica como agente preservativo. El producto se mantiene a 4°C, a cuya temperatura es estable durante 3 meses por lo menos.

5. El comportamiento de un lote de reactivo de diagnóstico, es evaluado mediante un ensayo contra un panel de por lo menos 50 sueros humanos que contienen diversos títulos conocidos de antígeno de Australia. Este comportamiento se compara con el comportamiento de ensayos standard para el antígeno de Australia (difusión de gel y contra-immunoelectroforesis) contra el panel y deberá proporcionar como mínimo una sensibilidad igual. La selectividad es evaluada
10. contra al menos 100 sueros humanos y muestras sanguíneas de las cuales se desconoce que contengan antígeno de Australia, y no más del 3 % de las muestras deberán proporcionar una reacción. El antisuero purificado del cobayo empleado en
15. los ejemplos 1 y 2 se preparará como sigue:
- Se inmunizan cobayos con antígeno de Australia purificado de las muestras de plasma humano por asociación isopónica en un gradiente de cloruro de cesio o bromuro de potasio en una centrifuga zonal seguido por centrifugación
20. zonal en un gradiente de sucrosa. Una inmunización primaria con antígeno en adyuvante completo de Freund en los lomillos de los pies es seguida por dos inoculaciones intraperitoneales de antígeno sin adyuvante. Después de la formación de
25. una polla de los sueros recogidos de los cobayos, se separa el anticuerpo residual a las proteínas del suero humano si es necesario poniendo en contacto el antisuero con suero normal humano polimerizado con cloroformato de etilo. El suero se purifica entonces mediante precipitación con sulfato sódico acuoso al 14 %, se dializa contra salina acuosa tamponada
- 30.



- nada con fosfato y puede calentarse a 56°C durante 30 minutos, si se desea, para la destrucción completa. A continuación, se añade azida sódica (0,1 %) como agente preservativo. Para su empleo en la preparación del reactivo de diagnóstico, el antisuero se diluye adecuadamente. La dilución óptima se elige mediante la preparación de pequeños lotes del reactivo de diagnóstico con diversas diluciones del antisuero y ensayando éstos contra un panel de sueros humanos de los cuales se sabe que contienen antígeno de Australia.
5. La dilución que proporciona el mejor comportamiento contra el panel cuando se reviste contra las partículas de resina, es seleccionada para la preparación del reactivo de diagnóstico. Normalmente, la dilución óptima está comprendida entre 1:20 y 1:100.
10. B. Métodos de ensayo para determinar la presencia del antígeno de Australia
15. EJEMPLO 3
- Sobre un portaobjetos de microscopio se coloca una gota (aproximadamente 25 μ l) de una muestra de ensayo de suero humano y se añade una gota similar de suero normal diluido (1:20) de cobayo. A continuación, se agita suavemente con una varilla aplicadora de madera, disponible, durante unos cuantos segundos. Se añade una gota de reactivo de diagnóstico, preparado según el ejemplo 1, y la mezcla se agita con la varilla aplicadora de madera disponible hasta que el diámetro de la gota es de 2 cm aproximadamente. El portaobjetos, colocado sobre una loseta negra, se balancea suavemente de un lado a otro durante 2 minutos. En este momento, una muestra de suero que contiene antígeno de Australia muestra una aglutinación definida, aunque una mues-
- 20.
- 25.
- 30.

405388

- 12 -



tra fuertemente positiva aglutinará a las partículas de poliestireno en un periodo de tiempo de 15 a 30 segundos. Los sueros negativos no producen ninguna aglutinación visible en un periodo de tiempo de 2 minutos.

5.

EJEMPLO 4

Sobre un portaobjetos negro de cristal (o plástico) se coloca una gota ($40 \mu\text{l}$) de una muestra de ensayo de suero humano. Se añade una gota de reactivo de diagnóstico preparado según el ejemplo 2 y la mezcla se agita con una varilla aplicadora de madera disponible hasta que el diámetro de la gota es de 2 cm aproximadamente. El portaobjetos se balancea suavemente de un lado a otro durante 5 minutos.

10.

En este momento una muestra de suero que contiene antígeno de Australia muestra una aglutinación definida, aunque una muestra fuertemente positiva aglutinará a las partículas de poliestireno en el espacio de 15 a 30 segundos. Los sueros negativos no producen ninguna aglutinación visible en el espacio de 5 minutos.

15.

EJEMPLO 5

Se añade una gota (aproximadamente $40 \mu\text{l}$) de sangre humana, venosa o capilar procedente de un pinchazo en el dedo, a un tubo que contiene $200 \mu\text{l}$ de diluyente de la siguiente composición: 0,1 % de citrato trisódico, 0,1% de azida sódica y 0,02 % de un surfactante no iónico (isooctilfenoxi-polietoxietanol, Triton X-100, Rohm & Haas Co.) en agua destilada. Después de mezclar mediante suave agitación y tras el reposo durante 10 minutos para proporcionar la lisis de las células de la sangre, se colocan dos gotas de la mezcla sobre un portaobjetos negro de cristal (o de plástico), se añade una gota del reactivo de diagnóstico

20.

25.

30.



preparado según el ejemplo 2 y se realiza entonces el ensayo como en el ejemplo 4.

EJEMPLO 6

5. Se añaden 20 μ l de sangre (sangre venosa o capilar) a 50 μ l aproximadamente de diluyente (composición como la del ejemplo 5) sobre un portaobjetos negro de cristal (o plástico). La sangre y el diluyente se agitan con una varilla aplicadora de madera disponible y la mezcla se deja reposar durante 5 a 10 minutos para asegurar la lisis completa de las células de sangre. Se añade una gota del reactivo de diagnóstico preparado según el ejemplo 2 y se realiza el ensayo como en el ejemplo 4.

EJEMPLO 7

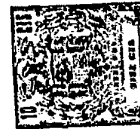
15. Se centrifuga sangre que contiene cualquiera de los anticoagulantes standard, tal como citrato, para separar la masa de las células. El plasma resultante separado de las células empacadas, se ensaya entonces con respecto al antígeno de Australia por cualquiera de los métodos indicados en los ejemplos 5 ó 6, exactamente igual que para la sangre total.

20. Cuando se realiza una serie de ensayos de acuerdo a cualquiera de los ejemplos 3 a 7, es conveniente incluir un suero "positivo" o "negativo" conocido en cada serie, con fines comparativos.

25. C. Método de ensayo para determinar la presencia del anticuerpo al antígeno de Australia

EJEMPLO 8

30. Se preparan diluciones seriales 1:2 de un suero humano conocido que contiene antígeno de Australia, empleando suero normal humano (es decir, libre de antígeno de Aus-



- tralia o de su anticuerpo) como diluyente. Una gota de cada una de las diluciones se ensaya con el reactivo de diagnóstico del ejemplo 4 y se registra la dilución más elevada en la cual se presenta aún la máxima reacción de aglutinación.
5. Esta dilución es la seleccionada para utilizarse en el ensayo. Se añade una gota (40 μ l) de la dilución seleccionada del suero que contiene antígeno a una gota (40 μ l) de una muestra de ensayo de suero humano sobre un portaobjetos negro de cristal (o plástico) y se mezclan las dos con una varilla aplicadora de madera disponible.
10. Después de reposar durante 5 minutos, para permitir que se presente la interacción antígeno-anticuerpo, se añade una gota (40 μ l) del reactivo de diagnóstico preparado según el ejemplo 1 y se mezcla brevemente con una varilla aplicadora de madera. El portaobjetos se balancea entonces suavemente de un lado a otro durante 5 minutos. En este tiempo, se habrá presentado ya la aglutinación con cualquier suero del ensayo que no contiene anticuerpo. Cuando no ocurre la aglutinación, esto da a demostrar la presencia de anticuerpo en el suero del ensayo.
15. En comparación, se realiza un ensayo simultáneo empleando una gota de un suero del cual se sabe que está libre de antígeno de Australia o de su anticuerpo; en este ensayo deberá esperarse una fuerte reacción de aglutinación.
20. El título de anticuerpo en cualquier suero de ensayo puede establecerse realizando el ensayo como anteriormente sobre diluciones al doble del suero del ensayo en el suero normal. El punto final es la dilución más elevada del suero del ensayo que fracasa para dar la aglutinación con el reactivo de diagnóstico mediante el ensayo descrito en el ejemplo 8.
- 25.
- 30.

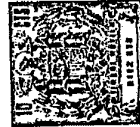
NOTA

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Inglaterra con el nº 36097/71 de 31 de julio de 1971, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre:
- PROCEDIMIENTO DE ENSAYO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANTIGENO DE AUSTRALIA EN UNA MUESTRA DE SANGRE; caracterizándose por lo siguiente:
- 1.- Procedimiento de ensayo para determinar la presencia de antígeno de Australia en una muestra de sangre, caracterizado porque comprende mezclar la muestra de ensayo con un volumen adecuado de una suspensión acuosa de partículas de resina sintética finamente divididas, de forma y tamaño sustancialmente uniformes, revestidas con el anticuerpo específico del antígeno de Australia; y continuar el mezclado durante al menos 2 minutos, indicando la aparición de aglomerados visibles la presencia del antígeno en la muestra de ensayo.
 - 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra de ensayo se pone en contacto con suero normal, durante dicho mezclado.
 - 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el suero normal se incluye en la suspen-

Handwritten signature or initials.

405388

- 16 -



sión de partículas de resina.

- 4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el suero normal se mezcla con la muestra de ensayo antes de que la muestra de ensayo se mezcle con la suspensión de partículas de resina.
5. 5.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la muestra de ensayo se agita con un agitador que ha sido revestido con los sólidos del suero normal.
10. 6.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la muestra de ensayo se coloca sobre una superficie que ha sido revestida con los sólidos del suero normal.
15. 7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque cuando se aplica a una muestra de ensayo de sangre total o de plasma, la muestra de ensayo se diluye primeramente con una solución que contiene un agente lisador y un anticoagulante.
20. 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el agente lisador es un surfactante no iónico de alquilfenol polioxietilado.
- 9.- Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque el anticoagulante es citrato sódico.
25. 10.- Procedimiento de ensayo para determinar la presencia de antígeno de Australia en una muestra de sangre, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

[Handwritten signature]

405388

- 17 -



Esta Memoria consta de 17 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31 JUL. 1972

PFIZER CORPORATION.

J. GOMEZ ACEBO Y MOVET
Por el Firmado L. Gasta Fernandez