

437426

P.- 60.347

HOE 74/B 009

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: A 61K

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en Marburg/Lehn, República Federal Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SUSTANCIA
CON EFECTO INMUNOLOGICO"

(Clase Internacional A61K; C12K)

Prioridad reivindicada: República Federal Alemana, 25 de
Junio de 1.974, N° P 24 30 380.8.

La invención se refiere a una sustancia con efecto inmunológico y a un procedimiento para su preparación por tratamiento de tripanosomas vivos con derivados de fenantridina, con el objetivo de eliminar su patogenicidad con una conservación completa de su potencia inmunológica. Esta medida, designada como atenuación química, hace posible desarrollar una vacuna que es utilizable también en el hombre.

La invención se refiere en especial a una vacuna que contiene los tripanosomas atenuados según la invención.

La enfermedad de Chagas es considerada como uno de los grandes problemas sanitarios de Sudamérica y Centroamérica. Es provocada por una infección con *Tripanosoma cruzi*. El número de los verdaderamente infectados en el subcontinente es discutible, pero la Organización Mundial de la Salud (WHO) estima en 1.960 el número de los infectados en aproximadamente 7 millones, el de expuestos a un peligro de infección en aproximadamente 35 millones.

Los métodos utilizados para la limitación de la infección son varios. En primer lugar está probablemente el trabajo sobre la extinción del transmisor (chinchas del género *Triatoma*) en las viviendas de la población, advertencia de la población y saneamiento de las posibilidades de vivienda. Este método, apoyado por la WHO, se lleva

a cabo ya con gran éxito en muchos países. Un segundo éxito en la lucha contra la enfermedad de Chagas fué la introducción del agente quimioterapéutico Lampit^(R) (marca comercial registrada de la firma Farbenfabriken Bayer, Leverkusen), un agente etiológico altamente activo en el hombre. Sin embargo, la problemática de la quimioterapia está en la aparición de modificaciones patológicas irreversibles, por ejemplo, en el corazón y en otros órganos huecos durante la infección, que ya no pueden ser resueltas por administración de los medicamentos en una fase relativamente tardía de la enfermedad. No obstante, una medida profiláctica utilizada generalmente en la lucha contra las infecciones de origen viral o bacteriano, la aplicación de una vacuna, es considerada aún hoy como unida a muchos riesgos.

En una serie completa de grupos de trabajos (por ejemplo, Kagan, Marsden, Nussenzweig, Menezes, Hungerer) pudo ser ciertamente demostrado que las formas de cultivo de *T. cruzi* naturalmente atenuadas, después de la inyección en ratones, protegen a éstos contra una infección mortal con tripanosomas patógenos. Sin embargo, la problemática es la patogeneidad residual, reconocible en diferente medida, de las formas de cultivo.

J. Emmett describió en 1.950 una supresión de la patogeneidad de *T. cruzi*. Irradió con rayos Röntgen

formas de cultivo aún altamente infecciosas, y encontró que una irradiación de 100.000 r dejaba ciertamente con vida a los tripanosomas, pero destruía su infecciosidad. Sin embargo, tales formas de cultivo irradiadas ya no
5 inmunizan a los ratones frente a una infección patógena (Chieri 1.968).

Los experimentos referidos en la descripción de la DAS 1234930 sobre la modificación química (por ejemplo con formalina, hidroxilamina y otros) de tripanosomas
10 tampoco condujeron a una vacuna.

Otro camino fué descrito por Fernandes y otros en 1.965. Incubaron formas de cultivo y formas sanguíneas con Actinomicina D. Con ello los tripanosomas pierden su capacidad de multiplicarse, pero conservan su potencia
15 inmunológica. Sin embargo una utilización de esta vacuna en el hombre se descarta de antemano por la elevada toxicidad de la Actinomicina D.

La misión de la invención aquí presentada se basa en encontrar una sustancia inmunológicamente activa
20 contra la enfermedad de Chagas que, por bloqueo de la patogeneidad residual de las formas de cultivo, no sea peligrosa para los hombres, pero que conserve todo su efecto inmunológico protector. La misma sustancia utilizada para la atenuación, en la concentración existente en la vacuna,
25 debe ser completamente no tóxica para los hombres. Sorpren-

dentamente esta sustancia se encontró en representantes de la clase de las fenantridinas.

Las fenantridinas fueron sintetizadas e investigadas ya en 1.938 con respecto a su actividad terapéutica frente a *Tripanosoma congolense* y *Tripanosoma vivax*. En 1.946 Browning y otros demostraron también una actividad quimioterapéutica frente a *T. cruzi* en ratones. Después aparecieron una serie de trabajos, por ejemplo por Riou y colaboradores sobre el mecanismo de la acción del bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio sobre *T. cruzi*.

Se ha encontrado ahora que una incubación de los tripanosomas con derivados de fenantridina modifica la vitalidad y la infecciosidad de tal forma que ratones, después de la inyección con tripanosomas tratados de este modo, no padecen ninguna infección patógena, pero desarrollan una protección inmunológica completa.

Por consiguiente el objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de una sustancia con efecto inmunológico, que está caracterizado porque tripanosomas suspendidos en un medio de cultivo acuoso monofásico son incubados con un derivado de fenantridina hasta la pérdida de su patogeneidad, y son obtenidos los tripanosomas atenuados de este modo.

Otros objetos de la invención son los tripanoso-

mas químicamente atenuados, obtenidos por el procedimiento según la invención, así como una vacuna que los contiene.

5 Como derivados de fenantridina en el sentido de la invención son adecuados todos los representantes fisiológicamente tolerables de esta clase de cuerpos. Especialmente adecuados son aquellos derivados que están sustituidos en la posición 3 y en la 8 con grupos amino, en la posición 6 con un radical fenilo y en la posición 5 con un grupo alcohol inferior. Como ejemplos de tales compuestos sean mencionados la 3,8-diamino-5-metil-6-fenil-fenantridina, la isometanidina y la 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridina. Puesto que los derivados de fenantridina son por lo general difícilmente solubles en agua, se recomienda utilizarlos según la invención en forma de sus sales solubles en agua. Como ácidos para la formación de sales son adecuados todos los ácidos orgánicos y sobre todo los ácidos inorgánicos que poseen aniones fisiológicamente tolerables y que forman sales solubles en agua con los derivados de fenantridina. Especialmente adecuadas en el sentido de la invención son las sales de los derivados de fenantridina con ácidos halohídricos, tal como ácido clorhídrico o ácido bromhídrico. Ejemplos de sales adecuadas son el bromuro de 3,8-diamino-5-metil-6-fenil-fenantridinio (bromuro de dimidio) el cloruro de isometamidio

10

15

20

25

(Samorin^R) y en especial el bromuro de 3,8-diamino-5-
-etil-6-fenil-fenantridinio (bromuro de Etidio^R).

5 Los derivados de fenantridina o sus sales son
utilizados en una concentración que, por una parte es su-
ficientemente grande para dar lugar a la deseada atenua-
ción química de los tripanosomas, y que por otra parte
no es tan grande como para dañar persistentemente a los
tripanosomas. Se han acreditado una concentración de 0,5
a 1000 γ por ml, de preferencia 5 a 100 γ /ml.

10 Los tripanosomas son sometidos al tratamiento
según la invención ventajosamente en una concentración
de 10^3 a 10^8 tripanosomas por ml. Una concentración de
tripanosomas especialmente ventajosa es de 1 a 5×10^7
tripanosomas por ml. Los tripanosomas son suspendidos a
15 esta concentración en un medio de cultivo líquido, que
es adecuado para mantener completamente el metabolismo
de estos organismos. Como medio de cultivo son adecuados
todos los medios idóneos para el mantenimiento de los
tripanosomas. Es decisivo que el medio de cultivo sea
20 lo más pobre posible o incluso que esté libre de deter-
minantes antígenos. Esta condición previa es cumplida
en especial por los medios exentos de proteínas. Como
ejemplo de medio de cultivo adecuado sean mencionados
el medio hígado-infusión-triptosa (LIT, según Camargo
25 (1.964)), además de los medios químicamente definidos,

exento de proteínas, como han sido descritos por ejemplo por Morgan, Morton y Parker (1.950), Salk, Younger y Ward (1.954) o Parker, Castor y McCulloch (1.957).

5 El tratamiento de los tripanosomas suspendidos en el medio de cultivo con un derivado de fenantridina o con su sal, se prolonga durante un tiempo de aproximadamente 1 a 120, de preferencia 20 a 48 horas. La temperatura es de aproximadamente 18 - 37° C, de preferencia 25 a 33° C. Correspondiendo a las leyes químicas generalmente
10 conocidas, el tiempo de tratamiento se prolonga tanto más cuanto más baja es la temperatura. Por consiguiente, en el sentido de los dicho anteriormente, con las duraciones de tratamiento más cortas hay que asociar las temperaturas más elevadas, y con las duraciones de tratamiento más
15 largas, las temperaturas inferiores.

Después del tratamiento, los tripanosomas son separados del medio de cultivo. Esto puede ocurrir por decantación, por filtración o convenientemente por centrifugación. En el caso de que se pretenda la preparación
20 de una vacuna, los tripanosomas así obtenidos pueden ser suspendidos de nuevo en una solución fisiológicamente tolerable, a la concentración adecuada para una vacuna.

En los ensayos descritos a continuación debe ser demostrado que los tripanosomas tratados según la invención
25 pierden su capacidad de multiplicación y su patogeneidad,

y que por consiguiente son adecuados para la preparación de una vacuna contra la enfermedad de Chagas.

5 En todos los experimentos citados a continuación, los medios y los aparatos tienen que ser manipulados bajo condiciones rigurosamente estériles.

El reconocimiento de la detención irreversible de la multiplicación por el tratamiento según la invención se realiza, por ejemplo, según el método siguiente:
Formas de cultivo epimastigóticas de *T. cruzi*, cepa Brasil,
10 son cultivadas (4-5 días a 28° C) sobre sangre en agar difásico (modificado según Senekjic). La fase líquida con los tripanosomas se filtra a través de gasa estéril. La suspensión se centrifuga durante 20 minutos a 5.000 x g, y el sedimento se lava dos veces con solución fisiológica de sal común. Los tripanosomas son llevados a un medio diluido según Parker (1.957) a una densidad de 2×10^7 /ml.

En cada caso 3 muestras de 2,5 ml son mezcladas con cantidades crecientes de bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridinio (5γ /ml, 10γ /ml, 100γ /ml).
20 3 muestras son tratadas con tiocida 1 : 10.000, que mata a los tripanosomas en esta concentración, con mantenimiento de la forma externa, y 3 muestras son dejadas sin tratar. Todas las preparaciones son incubadas durante 24 horas a 28° C, después centrifugadas durante 20 minutos a
25 5.000 x g y el sedimento recogido en 2,5 ml del medio di-

luído 1 : 10 según Parker (1957). Todas las muestras son mezcladas con timidina ^{14}C radiactiva (0,2 μC) e incubadas durante 24 horas a 28°C. Después los tripanosomas son separados sobre un filtro Sartorius y lavados 3 veces con solución fisiológica de sal común. Se evalúa cuantitativamente la radioactividad de las muestras.

La inhibición de la asimilación de la timidina ^{14}C en los tripanosomas es una medida del impedimento de la capacidad de multiplicación.

10

Resultados:

	Inhibición de la asimilación de timidina ^{14}C
Control de tiodida	100%
Bromuro de etidio 100 γ /ml	100%
15 " " 10 γ /ml	88%
" " 5 γ /ml	63%
no tratada	0%

Como muestra la tabla anterior los tripanosomas tratados según la invención han perdido parcial o totalmente su capacidad de multiplicación.

El reconocimiento de la pérdida de la patogeneidad después de la incubación con bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridinio puede ser realizado, por ejemplo, como sigue:

25

A. En cultivos de células cardiacas

30 corazones de ratones adultos, apareados consanguíneamente, no infectados (raza NMRI), peso de un ratón aproximadamente 20 g. tomados bajo condiciones rigurosamente estériles, son mezclados y triturados mecánicamente en 5 ml. de solución de sal común tamponada con fosfato, de pH 7,4 (PBS 7,4), siendo desechados los trozos de tejido conjuntivo sanguinolentos y blanquecinos. El material homogéneo de corazón se traslada a un matraz para tratamiento con tripsina y se llena con 20-30 ml de PBS 7,4. La suspensión es agitada breve y vigorosamente con el agitador magnético, y después de un breve reposo se separa por decantación el material que sobrenada, conjuntamente con los eritrocitos que se encuentran en él. El residuo se agita durante 10 minutos a 35°C con adición de 20 ml de una solución de tripsina (97 ml del PBS 7,4, 3 ml de bicarbonato de sodio al 5 por ciento, 0,25 % de tripsina). Después de un breve reposo se separa por decantación el líquido que sobrenada. El residuo se somete otras 6-7 veces al tratamiento con tripsina. Los líquidos que sobrenadan separados por decantación son centrifugados (400 x g, 10 minutos); los sedimentos son recogidos en 75 ml de la solución siguiente, que en lo sucesivos es designada como medio de aplicación Dulbeccos:

20 % de suero de ternera fetal
10 % de Dulbeccos, de la firma Biocult Lab., Glasgow
7 % de bicarbonato de sodio
2 % de glutamina
5 0,5 % de penicilina / estreptomina
completado hasta 100 % con agua bidestilada.

En cada caso 3 ml de la suspensión del tejido
de células cardíacas son llevados a tubitos, los llamados
10 tubos Leighton que están provistos con cubiertas de vidrio
pequeñas de 13 x 54 mm. Los tubitos cerrados con tapones de
silicona son incubados a 37°C. Al cabo de 24 horas se ha for-
mado una capa de células (monocapa).

Ratones apareados consanguíneamente del género
15 NMRI, que unos 12 días antes habían sido infectados por vía
subcutánea con T. cruzi cepa Brasil, son desangrados en con-
diciones estériles y la sangre se recoge en tampón de ci-
trato. Se diluye con el medio de aplicación Dulbeccos, de
modo que se obtiene una concentración final de $1,5 \times 10^6$
20 tripanosomas /ml. La suspensión de tripanosomas se divide
en dos mitades, y una de las mitades se ajusta con bromuro
de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridinio a 10μ /ml.
Ambas preparaciones son incubadas durante 24 horas a 28°C.
Después los tripanosomas son separados por centrifugación
25 y recogidos en medio de aplicación Dulbeccos fresco

($1,5 \times 10^6$ /ml).

Después de la eliminación del medio de los cultivos de células, se añaden en cada caso 3 ml de la suspensión de tripanosomas ($4,5 \times 10^6$ en total) en los tubos Leighton y se incuban a 33°C durante 72 horas. Después se cambia el medio y se incuba otras 48 horas.

Las cubiertas de vidrio pequeñas recubiertas con la capa de células, que se encuentran en los tubos Leighton, son teñidas según Giemsa.

10

Resultado:

Las células que habían sido incubadas con los tripanosomas no tratados, están infectadas entre 40 y 70 %, como muestra la imagen microscópica. Sin embargo, las células que habían sido incubadas con tripanosomas que fueron tratados previamente con bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridinio, no están infectadas.

15

B. En ratón

Ratones NMRI, que fueron infectados unos 10 días antes con aproximadamente 5×10^4 tripanosomas de la cepa Brasil por ratón, fueron desangrados bajo condiciones rigurosamente estériles, en presencia de heparina (concentración media 50-200 $\times 10^6$ /ml). La suspensión se ajusta con el medio según Parker (1957) a 2×10^6 /ml y se divide en dos partes. Una de las mitades se mezcla con bromuro de 3,8-dia-

25

mino-5-etil-6-fenil-fenantridinio (concentración final 10 γ /ml). Ambas suspensiones se incuban a 37°C durante 24 horas. Las suspensiones así incubadas son aplicadas por vía subcutánea (0,5 ml por animal = 1 x 10⁶ tripanosomas por animal) a los ratones (12-14 g). El curso de la enfermedad se sigue con ayuda de los pesos, de la parasitemia y de la muerte de los animales.

Resultado:

Bacilo	Tratamiento	peso	parasitemia	muerdes/número total
T.cruzi	10 γ /ml x)	creciente	0 a extremadamente baja	0/10
T.cruzi	--	decreciente	elevada	10/10

x) bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridinio.

Los tripanosomas tratados según la invención tienen propiedades inmunizantes, como se comprueba posteriormente.

El reconocimiento del desarrollo de una inmunidad protectora puede ser conducido, por ejemplo, como sigue: 2 grupos de ratones son inoculados con tripanosomas (forma epimastigótica). En el grupo A, de 10 ratones, reciben cada uno por vía subcutánea 0,5 ml de formas de cultivo (5 x 10⁷ por animal), en el grupo B, de 10 ratones, formas de culti-

vo que han sido tratadas de acuerdo con el ejemplo según la invención (5×10^7 por animal), en el grupo C, de 10 ratones, 0,5 ml de sal común. Al cabo de 21 días, todos los animales son infectados con tripanosomas patógenos de la cepa Brasil (1×10^5 por animal, por vía subcutánea).

Resultados: Los animales de los grupos A y B sobreviven en un 100% por lo menos 100 días después de la infección, los animales de control del grupo C mueren todos en el intervalo de los días 10-15 después de la infección.

Con ello se demuestra que una administración parenteral de las tripanosomas atenuados según la invención, puede proteger contra una infección mortal de tripanosomas.

Por consiguiente, es por último otro objeto de la invención preparar vacunas contra la enfermedad de Chagas, que contienen tripanosomas atenuados según la invención.

La preparación de una vacuna que contiene como principio activo la suspensión de los tripanosomas según la invención en un medio acuoso fisiológicamente tolerable, se puede realizar del modo conocido por el técnico, de preferencia con estabilización de los tripanosomas con coloides protectores, por ejemplo con proteínas, tal como albúmina, o con polisacáridos, tal como dextrano.

La invención se ilustra más detalladamente en el siguiente ejemplo:

Ejemplo

Tratamiento de las formas de cultivo de T. cruzi con bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridinio.

5 Todos los aparatos y medios tienen que ser manipulados bajo condiciones rigurosamente estériles.

El material de partida es la suspensión de T. cruzi en la fase líquida de un cultivo de sangre en agar. El cultivo de 5 días se decanta a través de una gasa estéril en una probeta, y en una cámara Thoma se determina la concentración de los tripanosomas en la suspensión de partida. En 10 el ejemplo es de 25×10^6 tripanosomas/ml en 75 ml, lo que corresponde a una cantidad total de $1,8 \times 10^9$. La suspensión se pasa a un vaso de centrífuga de 250 ml con tapón a rosca (Sorvall USA, Rotor GSA, frascos de policarbonato, 15 cubierta estanca de plástico con juntas anulares tóricas) y se centrifuga durante 20 minutos a 4°C en una Sorvall RC-2-B a 4500 revoluciones por minuto ($= 3300 \times g$). Se separa por decantación el líquido que sobrenada. El sedimento se vuelve a suspender en 100 ml de NaCl fisiológico y 20 se centrifuga de nuevo bajo las mismas condiciones. Se separa por decantación el líquido que sobrenada y el sedimento se suspende en el vaso de centrífuga, en un medio de la composición siguiente:

Aminoácidos	ml/l	Vitaminas	mg/l
Clorhidrato de alanina	25,0	Acido aminobenzoico	0,050
Arginina	70,0	Acido ascórbico	50,000
Acido aspártico	30,0	D-biotina	0,010
Clorhidrato de cisteína H ₂ O	260,0	D-pantotenato de calcio	0,010
Cistina	20,0	Cloruro de colina	0,500
Acido glutámico	75,0	Cocarboxilasa	1,000
Glutamina	100,0	Acido fólico	0,010
Glicina	50,0	Inosita	0,500
Clorhidrato de histidina, H ₂ O	20,0	Nicotinamida	0,025
Hidroxiprolina	10,0	Acido nicotínico	0,025
Isoleucina	20,0	Clorhidrato de pirido- xal	0,025
Leucina	60,0	Clorhidrato de piri- doxina	0,025
Clorhidrato de lisina	70,0	Riboflavina	0,010
Metionina	15,0	Clorhidrato de tiamina	0,010
Fenilalanina	25,0		
Prolina	40,0		
Serina	25,0		
Treonina	30,0		
Triptófano	10,0		
Tirosina	40,0		
Valina			

además de las sales inorgánicas y de otros componentes:

	Tween 80	5,0	Acetato de sodio $3H_2O$	83,0
	Colesterina	0,2	Glucuronato de sodio	4,8
5	Coenzima A	2,5	Timidina	10,0
	Deoxiadenosina	10,0	Sal monosódica del tri- fosfopiridin-nucleótido	
	Clorhidrato de deoxici- tidina	10,0	(TPN)	1,0
	Deoxiguanosina	10,0	Tetrahidrato de uridin-5'- trifosfato tetrasódico	
			(UTP)	1,0
10	Tetrahidrato de difos- fopiridin-nucleótido (DPN, $4H_2O$)	7,0	NaCl	6800
			KCl	400
	Flavina-adenina- dinucleótido (FAD)	1,0	$MgSO_4$, $7H_2O$	200
	L-glutamina	10,0	$CaCl_2$ (anhidro)	200
			Glucosa	1000
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	140	Rojo de fenol	17
15	$NaHCO_3$	2200		

pH 7,2

en lo sucesivo sedignado "medio".

20 Por adición de 85 ml de medio y de 5 ml de una solución de
0,9 mg de bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridi-
nio en el medio (concentración final 10μ /ml en 90 ml)
filtrada estérilmente a través de un filtro Millipore (ta-
maño de poros $0,2 \mu$) se forma una suspensión de 2×10^7
25 tripanosomas /ml. Esta suspensión se incuba durante 24 ho-
ras a $28^\circ C$ en una estufa de cultivos. Al cabo de 24 horas

se centrifuga de nuevo a 4500 revoluciones por minuto y a 4°C en la centrífuga Sorvall. El líquido que sobrenada se desecha y el sedimento se recoge en 18 ml de medio.

5 La concentración final resultante de 1×10^8 tripanosomas/ml es adecuada, por ejemplo, para la inmunización de ratones.

10

REIVINDICACIONES

15 1ª.- Procedimiento para la preparación de una sustancia con efecto inmunológico, caracterizado porque los tripanosomas suspendidos en un medio de cultivo líquido, acuoso, monofásico, son incubados con un derivado de fenantridina hasta la pérdida de su patogeneidad, y a continuación son obtenidos los tripanosomas atenuados de este modo.

20 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque como derivado de fenantridina se utiliza el bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridinio.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el medio de cultivo está exento de proteínas.

25 4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones

12.5.75.

1ª - 3ª, caracterizado porque los tripanosomas están en la suspensión en una concentración de 10^3 - 10^8 /ml.

5 5ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 4ª, caracterizado porque el derivado de fenantridina está en una concentración de 0,5-1000 μ /ml.

6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 5ª, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo durante 1 - 120 horas a 18-37°C.

10 7ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 6ª, caracterizado porque los tripanosomas están en la suspensión en una concentración de 1×10^7 a 5×10^7 /ml.

8ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 7ª, caracterizado porque el derivado de fenantridina está en una concentración de 5 - 100 μ /ml.

15 9ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª - 8ª, caracterizado porque la incubación se lleva a cabo durante 20-48 horas a 25-33°C.

10ª.- Procedimiento para la preparación de una sustancia con efecto inmunológico.


20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

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

Madrid,

8 AGO. 1975

I.A.

Alberto de Eizaguirre
Por Poder.


4-8-75
VGD.

- 20 -