

29 OCT. 1975

441738

P.-61.522
Dr. 1351

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de INSTITUT PASTEUR

entidad francesa

establecida en 25, rue du Docteur Roux, Paris 15ème,
Francia

por: "PROCEDIMIENTO DE DOSIFICACION INMUNOENZIMATICA
DE PROGESTERONA"

18.10.75

- 1 -

La presente invención se refiere a un procedimiento de dosificación inmunoenzimática de progesterona.

El procedimiento según la invención aprovecha las enseñanzas de la técnica conocida en relación con una dosificación que implica una competencia entre moléculas de progesterona libre, por un lado, y moléculas de progesterona copuladas a una enzima, por otro lado, frente a los mismos puntos anticuerpos antiprogesterona (Ab_1), y la precipitación de los Ab_1 por anti-gammaglobulinas insolubilizadas (Ab_2).

El desarrollo de las dosificaciones inmunoenzimáticas es reciente. La fijación de una enzima a un antígeno o a un anticuerpo se describió por primera vez para estudios histológicos [NAKANE P.K. and PIERCE G.B. Jr (1967). Enzyme-labeled antibodies. Preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem. Cytochem. 14,929, AVRAMEAS S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehydes. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry 6,437]. La primera dosificación inmunoenzimática se refiere a la de la hormona gonadotropa coriónica (HCG) en la orina, en la que la HCG está marcada con peroxidasa y el anticuerpo copulado a celulosa [VAN WEEMEN B.K. and SCHUURS A.H.W.M. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates FEBS Letters 15,232].

Los autores han empleado la técnica de polimerización del primer anticuerpo o la de la polimerización del segundo anticuerpo.

5 La primera técnica mostraba una sensibilidad del mismo orden que la obtenida por inhibición de la hemoaglutinación. La segunda técnica era de 10 a 20 veces más sensible, pero no alcanzaba la sensibilidad de la dosificación radioinmunológica.

10 La dosificación radioinmunológica se basa en una dilución isotópica en un medio de reacción que obedece a la ley de acción de masas.

Hay competencia entre las moléculas radiactivas y las moléculas del patrón o de la muestra desconocida frente a los mismos puntos anticuerpos.

15 La primera dosificación inmunoenzimática de una sustancia de bajo peso molecular, la DNP ENGVALL E. and PERLMANN P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology 109, 1297, no mostró una sensibilidad importante, porque para obtener un 50% de inhibición de la actividad enzimática había que añadir $5 \cdot 10^{-4}$ moles/litro de DNP.

25 Se han presentado otros sistemas inmunoenzimáticos para la morfina RUBENSTEIN K.E., SCHNEIDER R.S.

and ULMAN E.F. (1972) "Homogeneous" enzyme immunoassay; a new immunochemical technique; B.B.R.C. 47,846 y los estrógenos VAN WEEMEN B.K. and SCHUURS A.H.W.M. (1972). Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. FEBS Letters 5 24,177. La sensibilidad de estas dosificaciones, aunque es mayor, no alcanza la de la dosificación radioinmuno-
lógica.

Las patentes francesas 73,17.181 y 71.46.179 se refieren a procedimientos de detección y determina-
10 ción de hapteno; en el primer documento citado, la naturaleza de la copulación del hapteno, sustancia de peso molecular elevado empleada para crear el anticuerpo, difiere de la de la copulación conjugado hapteno-enzima.

La diferencia en la naturaleza de la copula-
15 ción puede deberse a:

- a) un enlace o un puente de naturaleza química diferente,
- b) haptenos de naturaleza química diferente que presentan una afinidad inmunológica,
- 20 c) copulación en otra posición de la molécula de hapteno.

Así, en la dosificación de la progesterona es preciso que los sistemas de determinación en que la progesterona-11-succinilfosfatasa alcalina está combi-
25 nada con la antiprogestero-11-succinil-seroalbúmina

bovina sean de cuatro a diez veces menos sensibles a la progesterona que los sistemas progesterona-11-succinil-fosfatasa alcalina/antiprogesterona-12-succinil-seroalbúmina bovina (pág. 10, líneas 11 a 20).

5 El principio en que se basa esta patente está en contradicción con la dosificación según la invención, que emplea la misma copulación hapteno-sustancia de peso molecular elevado y hapteno-enzima.

10 La segunda patente citada no describe la dosificación de la progesterona según la presente invención.

El procedimiento de dosificación inmunoenzimática de progesterona según la invención permite obtener una curva de dosis-respuesta cuya sensibilidad es equivalente a la de la dosificación radioinmunológica, pero sin presentar los inconvenientes que acompañan a este tipo de dosificación: coste elevado de fabricación del material (contadores de radioactividad, líquidos de centelleo, sustancias radiactivas), inconvenientes de las sustancias radiactivas (degradación del antígeno o del anticuerpo radiactivo, período del elemento), y problemas de sanidad y legislación.

15 La excelente sensibilidad de la dosificación se obtiene gracias particularmente al empleo de un anticuerpo antiprogesterona específico.

20 Es sabido al preparar un anticuerpo de hap-

teno copulando el hapteno a una sustancia de peso molecular elevado, que en general es una proteína, inyectando este producto de copulación a un animal, y aislando los anticuerpos de manera clásica. En la invención se emplea este medio adaptándolo a las necesidades particulares de un procedimiento muy sensible de dosificación inmunoenzimática.

El procedimiento de dosificación inmunoenzimática de la progesterona, que recurre a reacciones que compiten en medio líquido de las moléculas de la progesterona citada, llamadas Ag, y moléculas de progesterona copuladas a una enzima, la beta-D-galactosidasa, moléculas llamadas Ag-GZ, frente a puntos iguales de un anticuerpo específico constituido por suero antiprogesterona, llamado Ab_1 , y a una precipitación de los complejos solubles obtenidos por medio de un segundo anticuerpo insoluble llamado Ab_2 , reacción que conduce a un residuo o sedimento que contiene todas las poblaciones de anticuerpos y a un líquido que sobrenada que contiene las fracciones de Ag y de Ag-GZ que no han reaccionado con Ab_1 , se caracteriza por emplear un mismo derivado de progesterona, a saber, el 11-alfa-hemisuccinato de progesterona, para el acoplamiento con la beta-galactosidasa y para la producción del suero antiprogesterona.

Según la presente invención, la copulación de la progesterona se efectúa con ayuda de un grupo funcional constituido por el radical hemisuccinato al nivel del carbono 11, lo que permite obtener un inmunógeno cuya inyección en el animal causa la formación de anticuerpos particularmente específicos. Esta elevada especificidad permite una dosificación inmunológica de la progesterona plasmática sin cromatografía previa de los extractos.

El procedimiento de dosificación inmunoenzimática puesto a punto requiere la interacción de 4 tipos de moléculas: un antígeno (o hapteno) (Ag) constituido por la progesterona; un antisuero (Ab_1) correspondiente elaborado a partir de 11- α -hemisuccinato de progesterona; un antígeno marcado por una enzima, es decir 11- α -hemisuccinato de progesterona marcado con β -galactosidasa (Ag-GZ); y finalmente un antisuero precipitante, insolubilizado (Ab_2). Al final de la reacción se obtiene un sedimento que contiene todas las poblaciones de anticuerpos y un líquido que sobrenada que contiene las fracciones de Ag y Ag-GZ que no han reaccionado con Ab_1 .

La medida de la actividad enzimática se efectúa ventajosamente en el sedimento.

La puesta en práctica del procedimiento re

quiere la preparación de los constituyentes. La enzima elegida, beta-D-galactosidasa, se purifica en primer lugar a partir de una cepa constituyente de E. Coli; las diferentes etapas de la purificación com-
5 prenden, por ejemplo, la descongelación de las bacterias, su toma en dos volúmenes del tampón de purificación (10 mM de tris acetato de pH 7,6, 10 mM de MgCl₂, 5 mM de Mg titriplex, 10 mM de β-mercaptoetanol (β-SH) y 0,5% de NaCl), una trituración y una
10 pasada por ultrasonidos; después de la centrifugación, se diluye dos veces el líquido que sobrenada con el mismo tampón, lo que causa la precipitación de ciertas proteínas. Se centrifuga, se decanta, y el líquido que sobrenada se precipita de nuevo con
15 sulfato de amonio al 33% de saturación. Este precipitado se pone en suspensión con el mismo tampón, se dializa hasta la desaparición total del sulfato de amonio, y la β-galactosidasa se purifica en una columna de DEAE-Sephadex en gradiente de molaridad. A
20 continuación se mide la actividad enzimática.

La dosificación se efectúa vertiendo 2 ml de una mezcla de β-galactosidasa en un tampón "PM₂" constituido por 70 mM de Na₂HPO₄, 30 mM de NaH₂PO₄, 1 mM de MgSO₄, 0,2 mM de MnSO₄ y 2 mM de Mg titriplex,
25 ajustándose el pH a 7, más 7 ml/l de β-SH con 0,5 ml

de ONPG (ortonitrofenil- β -D-galactósido) al 4%. Se deja incubar al baño María a 28°C y se interrumpe la reacción por medio de 1 ml de Na₂CO₃ 1 M. El número de unidades enzimáticas está dado por la fórmula:

5

$$\text{Unidades enzimáticas} = \frac{\text{D.O. 420 nm} \times \text{dil}}{\xi \cdot t \text{ (mn)}}$$

10

siendo $\xi = 5 \cdot 10^{-3}$

Si se efectúa la incubación a 45°C en "PM₂" β -SH, el número de unidades enzimáticas se obtiene por división por un factor de corrección igual a 2,6.

15

20

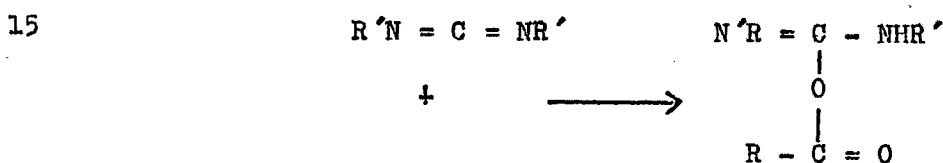
25

El sustrato empleado para la medida de la actividad enzimática es galactósido de orto-nitrofenol. En presencia de β -galactosidasa, hay desprendimiento de orto-nitrofenol (de color amarillo) y de galactosa en el medio de reacción. El desprendimiento de orto-nitrofenol es función de la cantidad de enzima presente en el medio. Para una concentración fija da de sustrato, y un tiempo fijado de incubación, el valor de la densidad óptica (debida a la intensidad de la coloración) medida en el espectrofotómetro varía en función de la mayor o menor cantidad de β -galactosidasa.

18.10.75

Esto permite definir una unidad enzimática como la cantidad de β -galactosidasa que hidroliza un micromol de sustrato por unidad de tiempo (= un minuto).

5 Se efectúa a continuación la copulación del 11- α -hemisuccinato de progesterona a la β -galactosidasa, purificada según el procedimiento antedicho, por medio de una carbodiimida "soluble". La reacción se efectúa en dos tiempos: la primera etapa, llamada "ac
10 tivación", consta de la reacción de la carbodiimida con el 11- α -hemisuccinato de progesterona, obteniéndose así una O-acilurea muy reactiva con los nucleófilos:



La segunda etapa consta de la reacción de la O-acilurea obtenida con la β -galactosidasa y más
25 concretamente de la copulación de manera covalente

parar la progesterona unida a la beta-galactosidasa (Pro=GZ) de la progesterona libre.

Se procede a continuación a la obtención del suero antiprogesterona, lo que representa una etapa particularmente importante, pues la especificidad de los anticuerpos antiprogesterona determina la precisión final de la dosificación. Según la presente invención, se copuló 11- α -hemisuccinato de progesterona a la seroalbúmina bovina (BSA) según técnicas conocidas [Erlanger B.F., BOREK F, BEISER S.M. and LIEBERMAN S. (1957). Steroid protein conjugates J. Biol. Chem. 228, 713. VAITUKAITIS J., RABBINS J.B., NIESCHLAG E. and ROSS T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen J. Clin. Endocr. 33,988].

La copulación de la progesterona con ayuda de un grupo funcional, el hemisuccinato, introducido al nivel del carbono 11, ha permitido obtener un inmunógeno cuya inyección en un animal causa la formación de anticuerpos particularmente específicos, como muestra la tabla que sigue.

TABLA I

<u>Esteroides</u>	<u>Reacciones cruzadas %</u>
5 Desoxicorticosterona	3
5- β -pregnan-3,20-diona	2,8
5- α -pregnan-3,20-diona	2
6- β -hidroxiprogesterona	1,2
17- α -hidroxiprogesterona	0,5
10 20- α -hidroxiprogesterona	0,4
Corticosterona	0,3
Testosterona	0,08
Cortisol	0,03
5-pregnenolona	0,03
15 Aldosterona	0,008
Estriol	menos de $<10^{-5}$

20 Estos resultados se obtuvieron según el principio siguiente:

25 Anticuernos antiprogesterona, unidos a la progesterona marcada con tritio, son susceptibles (como consecuencia de un cambio con progesterona fría, no marcada, introducida en el medio) de liberar progesterona radiactiva y desplazar espontáneamente la progesterona fría de su lugar.

El equilibrio que se establece entre la cantidad de progesterona-anticuerpos (Ac) no marcada y la progesterona-Ac marcada es función de la progesterona fría añadida al medio. Por el contrario, si en lugar de progesterona fría se añade otro esteroide, tal como aldosterona, por ejemplo, habrá poco cambio entre la progesterona radiactiva unida y la aldosterona del medio. Como los anticuerpos antiprogestero-
5 progesterona son muy específicos de la progesterona, se unirán muy debilmente a la aldosterona.
10 aldosterona.

Por lo tanto, cuanto más débil sea el intercambio entre el complejo inicial (progesterona-anticuerpos) radiactivo y el compuesto añadido al medio, más pequeño será el tanto por ciento de la reacción cruzada.

Esta elevada especificidad permite, por ejemplo, una dosificación inmunológica de la progesterona plasmática sin cromatografía previa de los extractos obtenidos tras una simple extracción por medio de un disolvente orgánico.
15

Finalmente se prepara el antisuero precipitante en dos etapas; su obtención propiamente dicha en primer lugar, y en último lugar la insolubilización por polimerización de los anticuerpos obtenidos. Para preparar el suero anti-gamma-globulinas de conejo, se inyecta, según el procedimiento descrito anteriormente, en la pro-
20
25

porción de 10 mg disueltos en 1 ml de suero fisiológico y 2 ml de "completo" de Freund por animal (cabra u oveja). Las activaciones se efectuaron todos los meses por medio de 2,5 mg de antígeno por vía intramuscular y subcutánea, y 2 mg al día siguiente por vía intravenosa. La cantidad de anticuerpos por ml se determinó por análisis en micro precipitación. Se emplearon tres antisueros, cada uno de ellos con una concentración de 2 mg/ml (cabra), 13 mg/ml (cabra) y 13,6 mg/ml (oveja). La insolubilización de los anticuerpos-antigammaglobulina de conejo se efectuó por medio de cloroformiato de etilo según el procedimiento siguiente: se precipitan las gamma-globulinas añadiendo un volumen de sulfato de amonio saturado a dos volúmenes de suero, se deja en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se centrifuga durante 15 minutos. Se toma de nuevo el precipitado, que se dializa frente a tampón de fosfato de sodio (pH 6,3) hasta desaparición del sulfato de amonio (que se comprueba con $BaCl_2$ al 1%). El producto obtenido, constituido por gamma-globulinas y otras proteínas, se hace pasar por una columna de DEAE celulosa, y las gammaglobulinas, eluidas por medio de un tampón de fosfato de sodio (pH=6,3) se sacan de la columna y se obtienen en un estado muy puro.

Otro método consiste en emplear el suero de cabra o de oveja, que se dializa directamente frente a tam

pón de fosfato de sodio, y se hace pasar, una vez dializado, por la columna de DEAE celulosa. La elución de las gamma-globulinas se hace por medio del mismo tampón de fosfato de sodio. Las gammaglobulinas obtenidas
5 están muy purificadas. Se prepara una disolución de 50 mg/ml de gamma-globulinas, y después se añade gota a gota el cloroformiato de etilo, en relación de 0,04 ml por ml de disolución. El pH se mantiene en 5,0. Después de agitar durante 3 horas se centrifuga y se lava tres
10 veces con agua fisiológica, antes de poner de nuevo el precipitado en el tampón. Finalmente, se homogeniza con ayuda de una jeringa provista de una aguja muy fina.

Para determinar las cantidades de anticuerpos polimerizados a emplear en la dosificación, hay que determinar el poder de unión del anticuerpo polimerizado;
15 con este fin, se incuban, a cada una de las diluciones (1/1, 1/10, 1/20, 1/50) de anti-gammaglobulinas polimerizadas, diluciones crecientes de suero antiprogesterona que van de la 1/100 a la 1/10.000. Después de la cen
20 trifugación, se añade líquido que sobrenada de cada tubo de reacción la misma cantidad de progesterona con tritio, con el fin de determinar la presencia eventual de anticuerpos antiprogesterona. Como ejemplo ilustrati
25 guiente: se mezclan 0,2 ml de suero antiprogesterona y

0,2 ml de anti-gammaglobulinas polimerizadas; se deja
incubar 30 minutos a 4°C y se centrifuga 10 minutos a
5000 r.p.m.; se añaden al líquido que sobrenada 50.000
cpm. de ³H-progesterona (0,1 ml), se deja incubar duran
5 te 30 minutos a temperatura ambiente, y después 30 mi-
nutos en hielo en fusión; se separan por medio de 1 ml
de dextrano sobre carbón, tras 10 minutos de contacto
se centrifuga, y después se procede al recuento de la
radiactividad en el líquido que sobrenada. Los resul-
10 tados obtenidos se expresan graficamente (figura 1); pa-
ra una dilución de antisuero dada, se empleará una con-
centración suficiente de anti-gammaglobulinas polimeriza-
das para que se una a ellas todo el primer anticuerpo;
así, por ejemplo, para una dilución de antiprogestero-
15 na a 1/5000, habrá que emplear una dilución al 1/10 de
anti-gammaglobulinas polimerizadas.

La presente invención proporciona, por lo tan-
to, un procedimiento de dosificación inmunoenzimática de
progesterona, que comprende una reacción inmunológica
20 propiamente dicha, en la que el extracto o el patrón
de progesterona se añade al suero antiprogestero-
na y al producto del acoplamiento progesterona- β -galactosida-
sa, y después una inmunoprecipitación por medio de un
anticuerpo insolubilizado; la actividad enzimática se
25 determina ventajosamente en el sedimento.

18.10.75

Para poner en práctica el procedimiento de la invención, se emplea preferiblemente un conjunto de reactivos compuesto esencialmente de:

- 5 - anticuerpos antiprogesterona (en forma concentrada o liofilizada),
- complejo de progesterona unida a la β -galactosidasa,
- anticuerpo precipitante (Ab_2),
- un sustrato de la enzima, tal como ONPG,
- 10 - un tampón, tal como tampón "FM₂",
- un juego de patrones de progesterona a diferentes concentraciones.

La dosificación enzimática se efectúa preferiblemente a 45°C, pero puede tener lugar también a 28°C.

15 Como ejemplo, se ha procedido a la dosificación de progesterona en un medio biológico, plasma de ratas gestantes, y se ha efectuado un estudio comparativo con la dosificación radioinmunológica.

20 La sangre de la vena yugular de ratas gestantes, con adición de heparina, se centrifuga durante 20 min. a 5000 r.p.m. y se decanta el plasma. Un volumen plasmático de 0,1 ml se pone en un tubo cónico de centrifuga normalizado (V=15 ml) y se incuba 2 horas a 60°C para reducir la unión de la progesterona a las proteínas vectoras. La extracción se efectúa con 10 ml de

25

éter de petróleo después de agitar durante 2 min. en el vórtice. La fase de éter de petróleo se separa y se evapora hasta sequedad en un tubo idéntico. El extracto seco se toma de nuevo en 0,5 ml de tampón "PM₂" y se deja 15 min a 45°C. Se hacen diluciones a 1/2 y a 1/5 y se toman fracciones de 0,1 ml por duplicado para efectuar las dosificaciones inmunoenzimática y radioinmunológica. En las mismas condiciones se trata 0,1 ml de plasma de rata macho o de tampón "PM₂" para apreciar la influencia del material específico (plasma y disolvente). Un estudio preliminar mostró, tras la adición de progesterona radiactiva al plasma, que la extracción con éter de petróleo era constantemente superior al 95%.

Las condiciones de la dosificación inmunoenzimática pueden resumirse como se ve en la Tabla II siguiente:

20

25

18.10.75

TABLA II

	Volumen (ml)	Condiciones ex perimentales
Ab ₁ (dilución 1/5000)	0,1	30 minutos temperatura del labora- torio
Extracto a dosificar o tipo	0,1	
Ag-GZ (80 unidades en- zimáticas a 28°C)	0,1	2 h. 30 min temperatura del labora- torio
Ab ₂ (dilución 1/10)	0,1	30 minutos temperatura del laborato rio

Como testigo experimental se emplea suero de conejo normal en lugar de Ab₁.

En la figura adjunta y en la Tabla III se muestra claramente que la sensibilidad de la técnica inmunoenzimática (E.I.E.) es equivalente a la obtenida por ensayo radioinmunológico (E.R.I.).

TABLA III

<u>RATAS GESTANTES</u>	<u>E.R.I. (ng/ml)</u>	<u>E.I.E. (ng/ml)</u>
92	30	37,5
91	29	31
61	35	32,5
11	40	38
12	36	34
1	46	47
17	44	44
31	30	32
31	30	26
68	32,5	39
63	25	25
9	13,8	12,8
87	16	18
70	13,6	14
11b	27,5	28
91a	14,4	12,4
11a	12,6	13
11a	12,5	13
20a	30	25
20b	24	24
16	15	17
7	10,5	13

18.10.75

- 21 -

TABLA III (CONTINUACION)

<u>MUJERES NO ENCINTA</u>	<u>E.R.I. (ng/ml)</u>	<u>E.I.E. (ng/ml)</u>
1	0,4	0,6
2	0,3	0,3
3	0,5	1
6	0,3	1,2
8	0,6	0,5
9	2,4	2,8
 <u>MUJERES ENCINTA</u>		
1	56	56
1	56	50
3	31	42

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Francia, con fecha 14 de Octubre de 1974, bajo el Nº 74 34.519, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

10

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

15
20
25

1ª.- Un procedimiento de dosificación inmunoenzimática de progesterona, que utiliza reacciones competitivas en medio líquido de las moléculas de progesterona citada, moléculas denominadas Ag, y moléculas de progesterona copuladas a una enzima, β -D-galactosidasa, moléculas denominadas Ag-GZ, frente a puntos iguales de un anticuerpo constituido por suero antiprogesteronona denominado Ab₁, y una precipitación de los complejos solubles obtenidos por un segundo anticuerpo in

• 18.10.75

- 23 -

soluble denominado Ab_2 , reacción que conduce a un residuo que contiene todas las poblaciones de anticuerpos y a un líquido que sobrenada que contiene las fracciones de Ag y de Ag-GZ que no han reaccionado con Ab_1 , caracterizado por emplear un mismo derivado de progesterona, el 11- α -hemisuccinato de progesterona, para la copulación con la β -galactosidasa y para la producción del suero antiprogesterona.

2^a.- Un procedimiento según la reivindicación 1^a, caracterizado porque la β -D-galactosidasa se purifica antes de la copulación con la progesterona.

3^a.- Un procedimiento según la reivindicación 2^a, caracterizado porque la copulación se efectúa por medio de un agente tal como una carbodiimida soluble.

4^a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el anticuerpo insoluble se ha insolubilizado por polimerización.

5^a.- Un procedimiento según la reivindicación 4^a, caracterizado porque los anticuerpos se purifican antes de la polimerización.

6^a.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el anticuerpo insoluble es anti-gammaglobulina polimerizada.

7^a.- Un procedimiento de dosificación inmunoen

zimática de progesterona.

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

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

Madrid,

29 OCT. 1975

P.A. Alberto de Elizaburu
Por Poder

18.10.75
MMM/

