

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21 48 1269	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	22-5-1979	

**PATENTE DE INVENCION**

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
23679 A/78	23-5-1978	ITALIA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12 D13/06 // A61K 31/18	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO ENZIMATICO-MICROBIOLOGICO PARA LA PRODUCCION DE AMINOACIDOS OPTICAMENTE ACTIVOS"		
71 SOLICITANTE (S)		
SNAMPROGETTI S.p.A., sociedad anónima italiana.		
DIRECCION DEL SOLICITANTE		
MILAN (Italia), Corso Venezia, 16		
72 INVENTOR (ES)		
Roberto OLIVIERI, Aurelio VIGLIA, Ludwig DEGEN, Leonello ANGELINI, Eugenio FASCETTI		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
Don JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO		

La presente invención se refiere a un procedimiento enzimático-microbiológico para la producción de aminoácidos ópticamente activos, particularmente D-aminoácidos, a partir de mezclas racémicas de sus N-carbamil-derivados o de las correspondientes idantoínas.

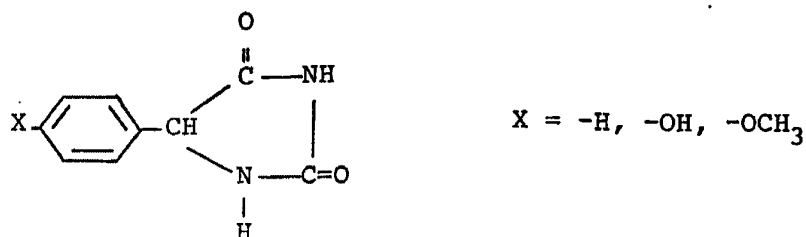
Algunos D-aminoácidos, especialmente fenilglicina y p-hidroxifenilglicina, constituyen importantes productos intermedios para la preparación de compuestos ampliamente usados en la industria farmacéutica. Los métodos químicos hasta ahora empleados para la separación de los antípodas ópticos y que se basan en el empleo del ácido canfosulfónico resultan muy costosos y proporcionan bajos rendimientos.

Otro método consiste en hidrolizar el D-acilaminoácido con la enzima D-acilasa.

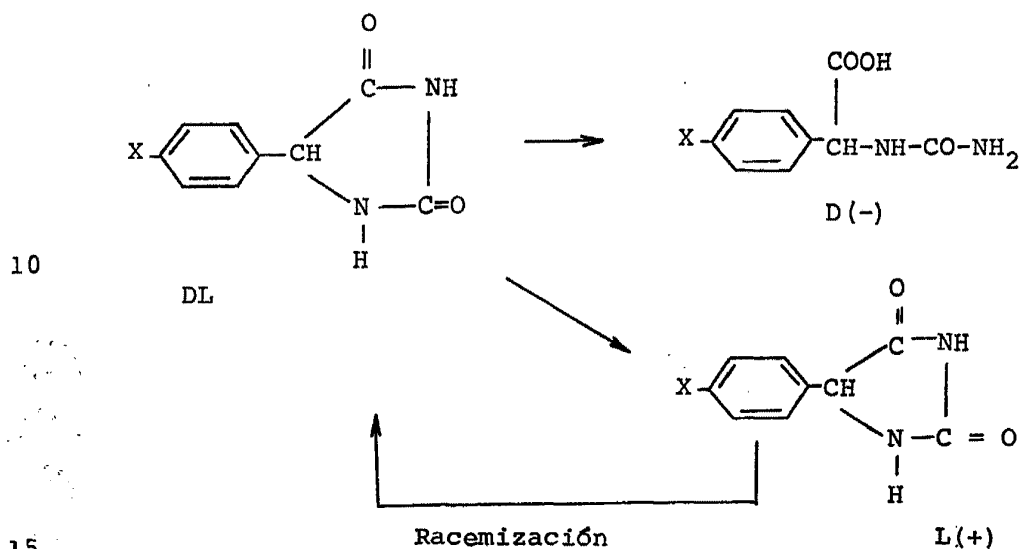
Sin embargo, estos preparados enzimáticos son siempre impuros por la presencia de L-acilasa, lo cual se traduce en la obtención de un producto de pureza óptica deficiente.

Un procedimiento para la resolución enzimática de D,L-aminoácidos o de derivados de los mismos ha sido ya propuesto por la misma entidad solicitante en la Patente italiana No. 987.278; la Patente belga No 864.935 y No 843.991, depositadas el 20 de Febrero de 1975, el 15 de Septiembre de 1978 y el 10 de Enero de 1977, respectivamente.

Este procedimiento consiste sustancialmente en someter a hidrólisis enzimática, mediante hidropirimidina hidrolasa (E.C. 3.5.2.2.) extraída de un órgano o de microorganismos, la forma racémica de compuestos de la siguiente fórmula general:



5 La hidrólisis se verifica según el esquema

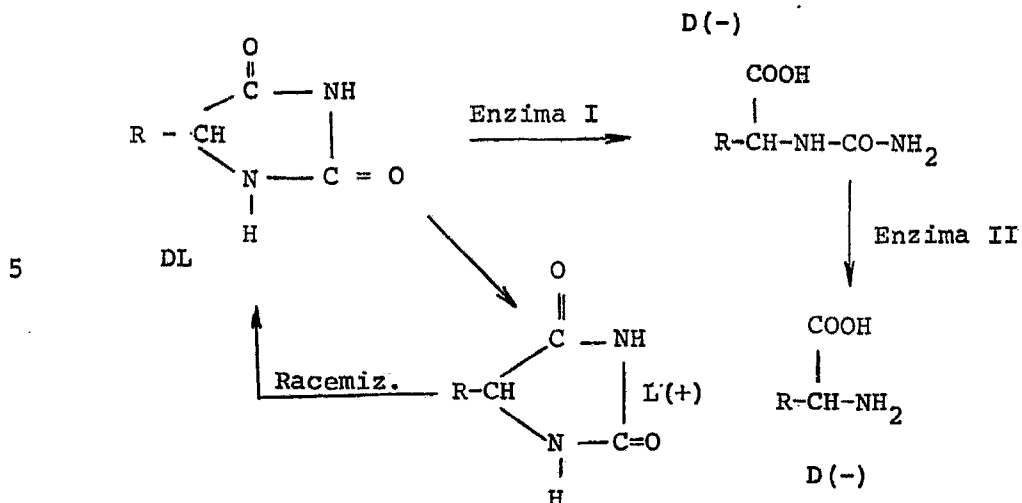


15

A continuación, el N-carbamilderivado es degradado a aminoácido D mediante oxidación con nitrito según el procedimiento reivindicado por la propia entidad solicitante en la Patente española Nº 447.176 del 4 de Marzo de 1977.

20

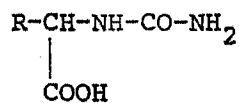
El procedimiento objeto de la presente invención se caracteriza porque los D-aminoácidos son producidos a partir de las correspondientes idantofinas utilizando reacciones hidrolíticas catalizadas exclusivamente por complejos enzimáticos según el siguiente esquema:



10 donde R puede ser un radical alifático o aromático, sustituido o no.

El procedimiento objeto de la presente invención se caracteriza, además, porque se pueden obtener D-aminoácidos también a partir de compuestos racémicos de la siguiente fórmula general

15

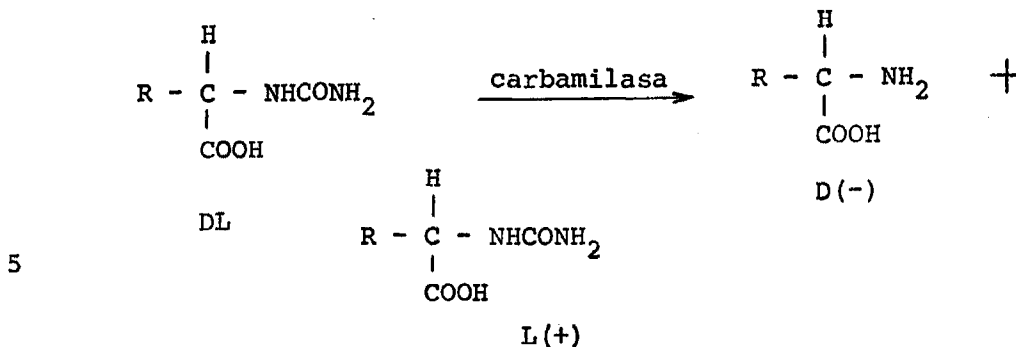


en la que R puede ser un radical alifático o aromático, sustituido o no, siendo la enzima II (carbamilasa) estereoeslectiva, para la forma D.

20

La hidrólisis enzimática, objeto de la presente invención, se verifica según el esquema ilustrado a continuación y tiene como consecuencia la producción de una sola forma estereoisómera de un aminoácido o de un derivado del mismo a partir de un compuesto racémico

25



Las preparaciones enzimáticas descritas en la presente invención se presentan, a diferencia de las que contienen D acilasa, absolutamente ausentes de actividad sobre el enantiómero de configuración L.

Ello permite obtener aminoácidos D con pureza óptica absoluta.

Los complejos enzimáticos empleados en el procedimiento según la presente invención se obtienen a partir de microorganismos del género *Agrobacterium* aislados de terreno agrario y contramarcados con los números 1302 - 1303 - 1304.

Los mismos poseen las siguientes características morfológicas y bioquímicas.

#### Morfología microscópica

Bastoncitos individuales, a veces emparejados, Gram negativos,  $0,8 \times 1,5 - 2,0 \mu\text{m}$ , cápsula y esporas ausentes, móviles con 4-6 flagelos peritricos.

#### Morfología macroscópica

Colonias sobre agar nutritivo (Difco): levantadas, márgenes enteros, color crema, transparentes, 0,5-1 mm de diámetro, superficie lisa.

Abundante crecimiento sobre calcio glicerofosfato-manitolonitrato-agar, con oscurecimiento y formación de halo.

Características bioquímicas

- Crecimiento entre 4° y 39°C sobre todos los terrenos simples de laboratorio incluso en ausencia de factores de crecimiento y aminoácidos utilizando  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  o aminoácidos como únicas fuentes de nitrógeno.
- 5 Oxidasas: positiva (N. Kovacs 1956 Nature, Londres 178, 703)  
 Catalasas: positiva (M. Levine, D.Q. Anderson. 1932. J. Bact. 23, 337-347)  
 Nitritos producidos de nitratos. (C.E. ZoBell. 1932, J. Bact. 24, 273)
- 10 Tween 80 no hidrolizado. (G. Sierra. 1957. Antonie van Leeuwenhoek 23, 15-22)  
 Caseína, gelatina, celulosa, amido, agar: no hidrolizados. (V.B.D. Skermann, A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2ª edición. The Williams and Wilkins Book Co. Baltimore. 1967)
- 15 3-cetoglicósidos producidos. (M.J. Bernaerts, J. De Ley. 1963. Nature 197, 406)  
 Anilina-manitol-agar azul: crecimiento con absorción del colorante. (A.A. Hendrickson, J.L. Baldwin, A.J. Riker, 1934, J. Bact. 28, 597-618)
- 20 Litmus milk: gris-negruzco.  
 Utilización carbohidratos: oxidativa (R.Hugh, E. Leifsen, 1953. J. Bact. 66, 24-26).
- 25 Los siguientes compuestos se emplean como única fuente de carbono en el terrero descrito a tal fin por R.Y. Stanier (R.Y. Stanier et al. 1966. J. Gen Microbiol. 43, 159-271): D(+) glucosa, L(+) arabinosa, D(+) xilosa, D(+) trealosa,

D(-) ribosa, L(+) ramnosa, lactosa, celobiosa, maltosa, citrato, acetato lactato, propionato, L-aspártico, L-asparagina, L-istidina, L-alanina, L-arginina.

Comparando estas características con las descripciones en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology VIII Ed., los microorganismos que forman parte de esta invención pertenecen a la familia de las Rizobiáceas, género *Agrobacterium*.

El cepo contramarcado con el N<sup>o</sup> 1302 se depositó el 6 de Abril de 1978 en el "Northern Regional Research Center" de Peoria donde recibió la sigla NRRL B 11291.

Según la presente invención, los microorganismos del género *Agrobacterium* son cultivados en condiciones aerobias en terrenos de cultura conteniendo fuentes de nitrógeno, carbono, fósforo y sales minerales a una temperatura comprendida entre 20° y 40°C, preferiblemente entre 25° y 35°C, durante un tiempo comprendido entre 10 y 48 horas, preferiblemente entre 20 y 30 horas, a un pH 6,0 ÷ 8,0, preferiblemente 7 ÷ 7,5.

Como fuentes de carbono pueden emplearse glucosa, lactato, acetato, corn steep liquor y lactosa.

Como fuentes de nitrógeno, productos hidrolizados de carne, de caseína o soja, sales amoniacales y urea, idantoina y N-carbamilderivados de los aminoácidos.

Un terreno de cultura idóneo presenta, por ejemplo, la siguiente composición:

peptona de carne	5 g
extracto de carne	5 g
glucosa	5 g

agua destilada 1000 c.c.  
pH 7,0 ÷ 7,2

Los D(-) aminoácidos son producidos directamente en los terrenos de fermentación conteniendo DL idantoínas o DL-N-carbamil derivados de los aminoácidos tanto como  
5 únicas fuentes de nitrógeno como integrados con fuentes de nitrógeno convencionales.

Los D(-) aminoácidos pueden también ser producidos utilizando directamente la pasta microbica como "resting cells" o bien utilizando extractos de la misma.  
10

La extracción de la pasta bacterica de los complejos enzimáticos empleados según la presente invención se efectúa mediante los comunes métodos utilizados en la enzimología.

A tal fin, las células son desintegradas con adecuados aparatos, por ejemplo French Pressure Cell Press, Manton  
15 Gaulin Homogenizer, desintegradores rotativos, etc., o bien con ultrasonidos. La hidrólisis de las idantoínas o de los N-carbamil derivados de los aminoácidos puede efectuarse adicionando a la mezcla de reacción la enzima bajo las siguientes formas: células frescas, células liofilizadas,  
20 células toluenizadas, polvo acetónico, o extractos brutos purificados.

Una ulterior mejora técnica y económica puede ser aportada inmovilizando las enzimas a través de combinaciones  
25 con compuestos macromoleculares mediante formación de enlaces químicos con la matriz o bien enlaces de tipo iónico o bien mediante inmovilización física.

Los siguientes ejemplos ilustran otras modalidades

operativas relativas a la presente invención pero no sólo limitativas de la misma.

EJEMPLO 1

5 Se preparó un caldo de cultura con la siguiente composición:

peptona de carne	5 g
extracto de carne	3 g
glucosa	5 g
agua destilada	1000 c.c.

10 El pH se ajustó a 7,2 con sosa y el terreno se distribuyó en porciones de 100 ml en frascos de 500 ml.

Después de esterilización durante 30 minutos a 110°C, los frascos fueron inoculados con una cultura del cepo N<sup>o</sup> 1302 desde un tubo conteniendo el mismo terreno con el 2 % de agar (DIFCO) e incubados durante 24 horas a 30°C bajo agitación orbital (220 rpm).

15 A partir de esta precultura (D.O. a 550 nm: 0,250 dil.X 1:10) se inocularon 1 ml en 5 frascos de 500 ml conteniendo 100 ml del mismo terreno y la cultura fue incubada a 30°C bajo agitación orbital (220 rpm) durante 24 horas (D.O. a 20 550 nm = 0,250 dil. 1:10).

Las células fueron luego recogidas, lavadas en solución fisiológica y finalmente mezcladas en suspensión en 100 ml de tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7 conteniendo 10 g de 25 D,L-5-fenilidantoina a la temperatura de 40°C bajo capa de nitrógeno UPP.

Después de 200 horas de incubación en estas condiciones se consiguió la hidrólisis completa a aminoácidos (D-fenil-

glicina) comprobada tanto por el análisis polarimétrico de la mezcla de reacción como por la cromatografía en capa delgada siguiendo la técnica descrita por Suzuki en J. of Chromatography, 80 (1973), 199-204.

5 El aminoácido fue aislado de la mezcla de reacción, previa precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético y su extracción mediante centrifugación, llevándose el pH al punto isoeléctrico (5,8).

El precipitado fue lavado con agua y secado bajo vacío.

10 La identidad del aminoácido D(-) fenilglicina fue comprobada en base de los espectros I.R. y N.M.R.

El poder óptico rotatorio específico resultó ser  $[\alpha]_D^{25} = -154^\circ$  (c = 1 % en HCl 1N) contra un valor de -157,8 indicado en la literatura para el aminoácido puro.

15 EJEMPLO 2

Células preparadas según el Ejemplo 1, procedentes de 100 ml de caldo de cultura, se mezclaron en suspensión en 10 ml de tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7 y se sometieron a sonificación a 5°C durante 10 min. El producto sonificado  
20 fue adicionado a 500 ml de una solución de D,L-N-carbamil-fenilglicina 20 nM en tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7 e incubado a 65°C.

La cinética de la reacción fue seguida determinando el amonio liberado en la hidrólisis del N-carbamilo según el  
25 método de fenol-hipoclorito.

Después de 40 horas de incubación, el ion  $\text{NH}_4^+$  había alcanzado la concentración de 10 milimoles/litro y no se registraban ulteriores incrementos en el tiempo.

La mezcla de reacción fue concentrada a 50°C bajo vacío hasta 100 ml.

Cuando el pH fue ajustado a 5,8 con HCl concentrado se obtuvo un precipitado que se recogió en filtro.

5 El precipitado así obtenido se disolvió en HCl 1N y se volvió a precipitar con NaOH a pH 5,8.

Después del secado se determinó el poder óptico rotatorio específico que resultó ser = -153°.

El espectro I.R. confirmó la identidad del aminoácido.

10 Del filtrado llevado lentamente a pH 2,5 con HCl 3N en baño de hielo se obtuvo un precipitado que fue secado y extraído con etanol absoluto en ebullición.

Por enfriamiento de la solución alcohólica se obtuvo un precipitado cristalino, el cual fue sometido después de 15 secado a cromatografía en capa delgada y espectro I.R.

Estos análisis confirmaron el hecho de que se trataba de N-carbamilfenilglicina químicamente pura.

El poder óptico rotatorio específico resultó ser de  $[\alpha]_D^{25} = +134^\circ$  (c = 1 % en NaOH 1N) contra el valor de +137°C indicado en la literatura para el enantiómero de configuración L.

### EJEMPLO 3

A partir de una precultura preparada según el Ejemplo 1 se inocularon 5 frascos de 500 ml conteniendo cada uno 100 ml 25 de un terreno constituido exclusivamente por una solución al 5 % de corn steep liquor llevada a un pH 7,8 con NaOH y esterilizada a 121°C durante 30 min.

La cultura fue incubada durante 24 horas a 30°C bajo

agitación orbital (220 rpm).

Las células recogidas por centrifugación fueron lavadas con tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7 y después mezcladas en suspensión en 100 ml del mismo tampón conteniendo 10 gramos de 5-parahidroxid-D,L-fenilidantoína e incubadas a 40°C bajo capa de nitrógeno UPP. Después de 160 horas de incubación en estas condiciones se alcanzó la hidrólisis completa a aminoácido (parahidroxifenilglicina D(-)), comprobada tanto mediante el análisis polarimétrico de la mezcla de reacción como por la cromatografía en capa delgada realizada según el método de Suzuki (J. of Chromatography, 80 (1973), 199-204).

El aminoácido fue aislado de la mezcla de reacción, previa precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético y su extracción por centrifugación, llevándose el pH al punto isoeléctrico (5,2).

El precipitado fue lavado con agua y secado bajo vacío.

La identidad del aminoácido fue comprobada en base de los espectros I.R. y N.M.R.

El poder óptico rotatorio específico resultó ser de  $[\alpha]_D^{25} = -156,5^\circ$  (c = 1 % en HCl 1N) contra un valor de  $-161,2^\circ$  indicado en la literatura para el aminoácido puro.

#### EJEMPLO 4

Se utilizaron células del cepo *Agrobacterium* sp. procedentes de 100 ml de caldo de cultura a base de Corn steep liquor y preparadas según el Ejemplo 3.

Las células lavadas se mezclaron en suspensión en 10 ml de tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7 y se sometieron a tolue-

zación durante 15' bajo agitación a temperatura ambiente.

La suspensión toluenizada fue adicionada a 500 ml de una solución de N-carbamil-D,L-parahidroxifenilglicina 20 mM en tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7 e incubada a 65°C bajo  
5 capa de nitrógeno UPP.

La cinética de la reacción fue seguida determinando el amonio liberado en la hidrólisis del N-carbamilderivado según el método de fenol-hipoclorito ya descrito en el Ejemplo 2.

10 Después de 18 horas de incubación, el ion  $\text{NH}_4^+$  había alcanzado la concentración de 10 milimoles/litro y no se registraron ulteriores incrementos en el tiempo.

En este punto, la mezcla de reacción fue concentrada bajo vacío a 50°C hasta 100 ml.

15 Cuando el pH fue ajustado a 5,2 con HCl concentrado se obtuvo un precipitado que se recogió en filtro.

Siguiendo exactamente el procedimiento ya descrito en el Ejemplo 2 se procedió al aislamiento y a la identificación del D-aminoácido y del N-carbamilo L, cuyos poderes  
20 ópticos rotatorios específicos resultaron ser respectivamente iguales a  $-157,2^\circ$  y  $+171^\circ$ , contra los valores de  $-161,2^\circ$  y  $+175,4^\circ$  indicados en la literatura para productos puros.

#### EJEMPLO 5

Se prepararon células del cepo *Agrobacterium* sp. del  
25 modo descrito en el Ejemplo 1.

Algunos gramos de pasta celular húmeda fueron mezclados en suspensión en tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7 y sometidos a tratamiento acetónico en frío.

Después de alejamiento de la acetona por filtración, la preparación acetónica así obtenida fue secada a peso constante bajo vacío a 35°C.

5 El material secado fue homogeneizado en un mortero y el polvo resultante fue empleado para las pruebas de actividad enzimática.

El polvo acetónico fue probado sobre los siguientes sustratos: N-carbamil-D(-)-alanina, N-carbamil-D(-)-valina, N-carbamil-D(-)-glutámico, N-carbamil-D(-)-parahidroxifenilglicina, N-carbamil-D(-)-paratoxifenilglicina, N-carbamil-D(-)-fenilglicina, N-carbamil-L(+)-fenilglicina, N-carbamil-D(-)-fenilalanina, N-carbamil-L(+)-glutámico, N-carbamil-D(-)(2-tienil)-glicina.

15 Por consiguiente, se prepararon soluciones 20 mM de cada carbamilderivado en tampón pirofosfato 0,1 M pH 7,7, y a 10 ml de cada una se adicionó una adecuada cantidad de polvo acetónico igual para cada sustrato individual.

La incubación se llevó a cabo bajo capa de nitrógeno UPP, bajo agitación y a la temperatura de 40°C.

20 Después de una hora de incubación se determinó la cantidad de aminoácido producido midiendo en la mezcla de reacción la concentración alcanzada por el ion  $\text{NH}_4^+$  según el método de fenol-hipoclorito ya descrito en el Ejemplo 2.

25 Se encontró que la mayor actividad de la enzima carbamilolítica se produce en combinación con la N-carbamil-D(-)-parahidroxifenilglicina.

En la Tabla 1 se ilustran los resultados del experimento, asumiéndose como 100 la actividad hidrolítica mostrada en

combinación con la N-carbamil-D(-)-parahidroxifenilglicina.

TABLA 1

	Sustrato	Actividad
	N-carbamil-D(-)-alanina	57,5
5	N-carbamil-D(-)-valina	34,25
	N-carbamil-D(-)-glutámico	21,7
	N-carbamil-L(+)-glutámico	0
	N-carbamil-D(-)-parahidroxifenilglicina	100,0
	N-carbamil-D(-)-parametoxifenilglicina	40,0
10	N-carbamil-D(-)-fenilglicina	81,25
	N-carbamil-L(+)-fenilglicina	0
	N-carbamil-D(-)(2-tienil)glicina	40,7
	N-carbamil-D(-)-fenilalanina	50,0

EJEMPLO 6

15 Se preparó un caldo de cultura con la siguiente composición:

	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	6 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
20	NH <sub>4</sub> Cl	2 g
	NaCl	0,5 g
	glicerina	5 g
	5-fenil-D,L-idantoina	2 g
	extracto de levadura	0,1 g
25	agua destilada	1000 cc

El terreno distribuido en porciones de 100 ml en frascos de 500 ml fue esterilizado a 116°C durante 30 min (la idantoina fue esterilizada por filtración).

Partiendo de una precultura preparada según el Ejemplo 1 se inocularon 5 ml por frasco y la cultura fue incubada a 30°C bajo agitación orbital a 220 rpm durante 36 horas.

Después se separaron las células por centrifugación, y del concentrado sobrenadante y llevado al punto isoeléctrico se recuperó el aminoácido.

De 10 litros de caldo de cultura así tratados se recuperaron 11,2 gramos de D(-)-fenilglicina cuyo poder óptico rotatorio específico resultó ser de  $[\alpha]_D^{25} = -156$  (c = 1 % en HCl 1N) contra un valor de  $-157,8^\circ$  indicado en la literatura para el aminoácido.

#### EJEMPLO 7

Se preparó un caldo de cultura con la siguiente composición:  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,2 g;  $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ , 6 g;  $KH_2PO_4$ , 3 g; 5-metil-idantofina, 2 g; NaCl, 0,5 g; glucosa, 1 g; extracto de levadura, 0,1 g; agua destilada 1000 cc pH = 7,1.

El terreno distribuido en porciones de 100 ml, en frascos de 500 ml, fue esterilizado a 116°C durante 20 min. (la metilidantofina fue esterilizada aparte).

Partiendo de una precultura preparada según el Ejemplo 1 se inocularon 5 ml por frasco y la cultura fue incubada a 30°C bajo agitación orbital a 220 rpm durante 24 horas.

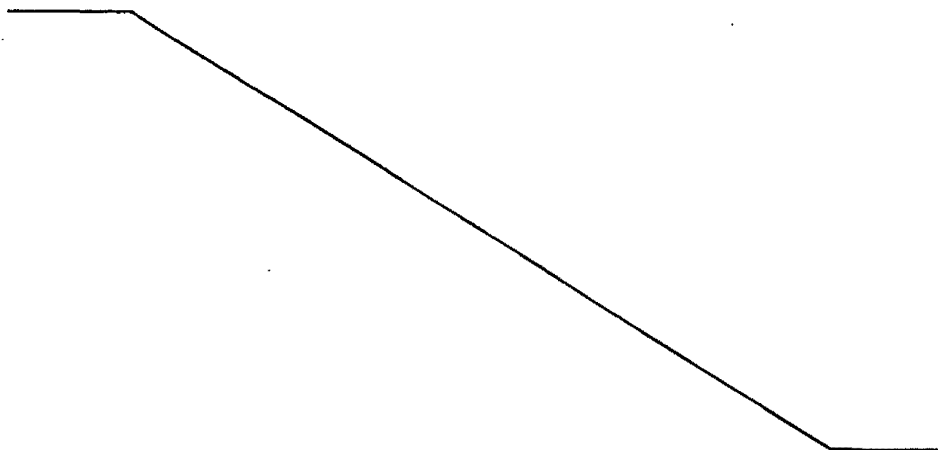
La pasta celular recogida por centrifugación de 1000 ml de caldo fue lavada en tampón fosfato pH: 7,5 y vuelta a mezclar en suspensión en 100 ml del mismo tampón conteniendo 4 g de DL-5-(2-tienil)idantofina.

La mezcla de reacción fue incubada a 40°C bajo capa de nitrógeno UPP. Después de 30 horas de reacción se alcanzó

la hidrólisis completa a aminoácido (D(-)(2-tienil)glicina). El aminoácido fue aislado concentrando la mezcla de reacción hasta 20 ml y ajustando el pH a 5,6. El precipitado así obtenido fue secado bajo vacío. La identidad del aminoácido fue comprobada en base de los espectros I.R. y N.M.R.

El poder óptico rotatorio específico resultó ser de  $[\alpha]_D^{25} = -72,6^\circ$  (c = 1 % en H<sub>2</sub>O) contra un valor de 73,7° indicado en la literatura para el aminoácido puro.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamental puede quedar sometido a variaciones de detalle. También se hace constar que esta invención corresponde a la descrita en la Solicitud de Patente Nº 23679 A/78, depositada en Italia en 23 de Mayo de 1978, cuya prioridad se reivindica de acuerdo con los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo esencial y por lo que se solicita Patente de Invención, por veinte años, lo que queda resumido en las siguientes reivindicaciones:



REIVINDICACIONES

1<sup>a</sup>.- Procedimiento enzimático-microbiológico para la  
producción de aminoácidos ópticamente activos, particular-  
mente D-aminoácidos, caracterizado porque se hace reaccionar  
5 una mezcla racémica de sus N-carbamil derivados o de las  
correspondientes idantofinas en presencia de complejos enzimá-  
ticos obtenidos de microorganismos del género Agrobacterium.

2<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, carac-  
terizado porque como microorganismo del género Agrobacterium  
10 se elige el contramarcado con la sigla NRRL B 11291.

3<sup>a</sup>.- PROCEDIMIENTO ENZIMATICO-MICROBIOLOGICO PARA LA  
PRODUCCION DE AMINOACIDOS OPTICAMENTE ACTIVOS,  
tal y como queda descrito y reivindicado en la presente  
memoria que consta de diecisiete hojas mecanografiadas por  
15 una sola cara.

BARCELONA, 22 de Mayo de 1979.

SNAMPROGETTI S.p.A.

P.P.

J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO

p. p. Fdca E. Ferragüela Colón

