



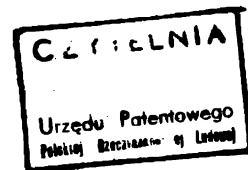
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 82 03 24 (P. 235606)

Pierwszeństwo: 81 03 24 Republika
Federalna Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 82 11 08

Opis patentowy opublikowano: 1986 07 25



Int. Cl.³ C07F 9/65

Twórcy wynalazku: Gerhard Scheffler, Ulf Niemyer, Norbert Brock,
Jörg Pohl

Uprawniony z patentu: Asta — Werke Aktiengesellschaft, Chemische
Fabrik, Bielefeld (Republika Federalna Niemiec)

Sposób wytwarzania nowych kwasów oksazafosforyno -4-tioalkanosulfonowych i ich obojętnych soli

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych kwasów oksazafosforyno-4-tio-alkanosulfonowych i ich obojętnych soli o ogólnym wzorze 1, w którym R_1 , R_2 i R_3 stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają atom wodoru, rodnik metylowy, etylowy, 2-chloroetylowy lub 2-metanosulfonyloksyetylowy i co najmniej dwa z tych symboli R_1 , R_2 i R_3 stanowią rodnik 2-chloroetylowy lub 2-metanosulfonyloksyetylowy, R_4 oznacza atom wodoru lub rodnik metylowy, X oznacza prostolanicowy lub rozgałęziony rodnik alkilenowy o 2—6 atomach węgla, ewentualnie podstawiony grupą merkapto przy atomie węgla zajmującym położenie -1, -2, -3, -4 lub -5 w łańcuchu alkilenowym, a Y^{\oplus} oznacza kation wodorowy, kation metalu alkalicznego lub metalu ziem alkalicznych, kation guanidyniowy, morfoliniowy lub cykloheksyloamoniowy lub kation wywodzący się z aminy $NR_5R_6R_7$, w której R_5 , R_6 i R_7 stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają atomy wodoru, grupy alkilowe i 1—2 atomach węgla lub grupy hydroksyetylowe albo w którym Y^{\oplus} oznacza kation etylenodwuamoniowy $H_2N-CH_2CH_2-NH_2^{\oplus}$ lub kation piperazoniowy i z stanowi liczbę 1, jeżeli Y^{\oplus} jest kationem jednozasadowym, lub z stanowi liczbę 2, jeżeli Y^{\oplus} jest kationem dwuzasadowym lub kationem związku o dwóch kationach jednozasadowych.

Ze względu na łatwą dostępność i dobre właściwości korzystnymi są te związki o wzorze 1, w któ-

2

rym Y^{\oplus} oznacza kation guanidyniowy, morfoliniowy lub cykloheksyloamoniowy lub kation wywodzący się z aminy $NR_5R_6R_7$, w której R_5 , R_6 i R_7 stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają atomy wodoru, grupy alkilowe o 1—2 atomach węgla lub grupy hydroksyalkilowe, albo w którym symbol Y^{\oplus} oznacza kation etylenodwuamoniowy $H_2N-CH_2CH_2-NH_2^{\oplus}$ lub kation piperazoniowy i z stanowi liczbę 1, jeżeli Y^{\oplus} jest kationem jednozasadowym, lub z stanowi liczbę 2, jeżeli Y^{\oplus} jest kationem dwuzasadowym lub kationem związku o dwóch kationach jednozasadowych.

Inne korzystne właściwości wykazują również sole potasowe i sole metalu ziem alkalicznych i kwasów o wzorze 1, toteż także te sole są korzystne.

Spośród kwasów o wzorze 1, zobojętnionych zasadami azotowymi, szczególnie korzystnymi są sole amoniowe, w których Y^{\oplus} stanowi kation NH_4^{\oplus} , sole cykloheksyloamoniowe, w których Y^{\oplus} stanowi kation $C_6H_{11}NH_3^{\oplus}$, albo sole guanidyniowe, w których Y^{\oplus} stanowi kation $NH_2=C(CH_2)^{\oplus}$.

Spośród nowych soli szczególnie łatwo dostępnym, a przeto i korzystnym jest cis-2-[2-(bis-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,2,3-oksazoforynylo-4]-tioetanosulfonian sodowy i odpowiednia sól amoniowa, cykloheksyloamoniowa oraz potasowa.

Numer położenia grupy tio w grupie alkileno-
wej X określa się zaczynając liczenie od atomu
węgla związanego z grupą sulfonową.

Szczególne znaczenie mają związki o wzorze 1,
w którym R_1 i R_2 oznaczają grupy 2-chloroetylowe,
 R_3 , R_4 oznaczają atomy wodoru, X oznacza grupę
etylanową, zaś Z oznacza liczbę 1, a Y^\oplus oznacza
grupę NH_4^\oplus , cykloheksyloamoniową lub NH_2^\oplus
 $=C(NH_2)_2$, albo X oznacza grupę $-CH_2CH_2CH_2-$,
Z oznacza liczbę 1, a Y^\oplus oznacza grupę
 $NH_2^\oplus=C(NH_2)_2$.

Nowe kwasy oksazafosforyno-4-tio-alkanosulfono-
we i ich obojętne sole o ogólnym wzorze 1, w któ-
rym wszystkie symbole mają znaczenie podane
przy omawianiu wzoru 1, wytwarza się sposobem,
polegającym według wynalazku na tym, że oksaza-
fosforynę o ogólnym wzorze 2, w którym R_1 , R_2 i R_4
mają znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1,
a Z oznacza atom wodoru lub rodnik alkilowy
o 1—4 atomach węgla, poddaje się reakcji ze
związkiem o ogólnym wzorze 3, w którym X i Y^\oplus
mają znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1
i w przypadku gdy Y^\oplus oznacza wodór, ewentualnie
zobojętnia się otrzymany kwas oksazafosforyno-4-
tio-alkanosulfonowy zasadą odpowiadającą inne-
mu znaczeniu symbolu Y^\oplus niż H^\oplus .

Jako odpowiednie rozpuszczalniki wchodzi w ra-
chubę: woda, alkohole, zwłaszcza alkanole o 1—6
atomach węgla, takie jak metanol, etanol, propa-
nol lub izobutanol, ketony alkilowe o 1—4 atomach
węgla w każdym rodniku alkilowym, takie zwi-
szcza jak aceton lub metyloetyloketon, dwumetylo-
formamid (DMF) — sześciometylotrójamid kwasu
fosforowego, chlorowcowane węglowodory o 1—3
atomach węgla, takie jak chloroform, dwuchlorek
etylenu, czterowodorofuran, eter etylowy albo po-
dobne rozpuszczalniki lub mieszaniny kilku takich
rozpuszczalników. Reakcję tę prowadzi się w tem-
peraturze od $-60^\circ C$ do $+80^\circ C$, korzystnie w tem-
peraturze od $-30^\circ C$ do $+60^\circ C$, zwłaszcza zaś w
temperaturze od $-30^\circ C$ do $+40^\circ C$, tzn. ewentu-
alnie wobec chłodzenia, w temperaturze pokojowej
lub wobec ogrzewania. Reakcję tę można przepro-
wadzać w obecności kwasowego katalizatora, ta-
kiego jak kwas nieorganiczny lub organiczny, zwi-
szcza kwas trójchlorooctowy, lub jak kwas Lewis'a,
np. $AlCl_3$, $ZnCl_2$ lub $TiCl_4$.

Kation Y^\oplus sulfonianu o wzorze 1 można wymie-
niać na inny kation, np. na odpowiednio nałado-
wanym jonicie. Wymianę tę zaleca się w takich
przypadkach, gdy sól o określonym kationie Y^\oplus
z trudem wytwarza się w sposobie według wynal-
azku. Żadaną sól można z wysoką wydajnością
uzyskiwać z innych, łatwo dających się wytwarzać
soli.

Nowe związki o wzorze 1 wyodrębnia się drogą
znanych sposobów obróbki takich produktów,
zwłaszcza drogą krystalizacji, strącania lub chro-
matograficznego oczyszczania, w szczególności na
środku o nazwie Sephadex. Identyfikację związku
dokonuje się za pomocą temperatury topnienia,
chromatografii cienkowarstwowej, analizy elemen-

tarnej, analizy widma w podczerwieni lub analizy
widma MRJ.

Związki stosowane jako substrat w sposobie
według wynalazku są znane, można je stosować w
postaci krystalicznej lub w postaci surowego pro-
duktu, a wytwarzać w znany, niżej omówiony
sposób.

4-hydroksy-oksazafosforyny otrzymuje się drogą
redukcji 4-hydronadtleno-pochodnych [np. A. Ta-
kamizawa i inni, J. Amer. Chem. Soc. 95, 589,
(1973) i ogłoszeniowy opis Republiki Federalnej
Niemiec DE-OS nr 2317178]. 4-alkoksy-oksazafosfo-
ryny tworzą się w warunkach kwasowej katalizy
w odpowiednim alkoholu z hydroksylowych po-
chodnych. Tiole wytwarza się na drodze reakcji
odpowiedniego bromoalkanosulfonianu sodowego
z tiomocznikiem, otrzymując sól tiuroniową, i roz-
szczepianie jej amoniakiem oraz przekształcenia
w żadaną sól tioalkanosulfonianu.

W przypadku gdy Y^\oplus oznacza kation metalu al-
kalicznego chodzi zwłaszcza o sól sodową lub po-
tasową, w przypadku, gdy Y^\oplus oznacza kation me-
talu ziem alkalicznych chodzi zwłaszcza o obojętną
sól wapniową lub magnezową, natomiast w przy-
padku gdy Y^\oplus oznacza kation cykloheksyloamoni-
owy chodzi o kation $C_6H_{11}NH_3^\oplus$, zaś w przypadku
gdy Y^\oplus oznacza kation $R_5R_6R_7N^\oplus$ chodzi o kation
wywodzący się z następujących amin: metyloami-
na, etyloamina, dwumetyloamina, dwuetyloamina,
trójmetyloamina, trójetyloamina, metyloetyloamina,
dwumetyloetyloamina, dwuetylometyloamina, 2-
-hydroksyetyloamina, dwu-(2-hydroksyetylo-
-amina, trój-(2-hydroksyetylo)-amina, (2-hydroksyetylo)-
-metyloamina, (2-hydroksyetylo)-dwumetyloamina,
dwu-(2-hydroksyetylo)-metyloamina, (2-hydroksy-
etylo)-etyloamina, (2-hydroksyetylo)-dwuetyloami-
na, dwu-(2-hydroksyetylo)-etyloamina, (2-hydrok-
syetylo)-metyloetyloamina.

Pod określeniem rowych pochodnych oksazafos-
foryny o wzorze 1 rozumie się wszystkie cztery
możliwe stereocizomery, tzn. oba racemiczne cis-izo-
mery (2rs, 4rs) i oba racemiczne trans-izomery
(2rs, 4rs) oraz cztery oddzielne optycznie czynne
cis-izomery (2r, 4s i 2s, 4r) i trans-izomery (2r,
4r i 2s, 4s), a nadto ich mieszaniny. Mieszaniny cis/
/trans można oddzielać w znany sposób, korzystnie
drogą frakcjonowanej krystalizacji. Związki optycz-
nie czynne można otrzymać znany sposóbem roz-
szczepiania racematów np. drogą frakcjonowanej
krystalizacji diastereoizomerycznych soli racemicz-
nego kwasu sulfonowego o wzorze 1 z optycznie
czynnymi zasadami albo ewentualnie drogą stoso-
wania optycznie czynnych substratów o wzorze 2
w syntezie.

Na ogół podczas syntezy powstają mieszaniny
cis/trans. Z nich, w przypadku łatwo krystalizują-
cych związków, otrzymuje się wykrystalizowaną
odmianę -cis lub -trans, zwłaszcza odmianę -cis.
Jeśli jednak reakcję tę prowadzi się w środowisku
bezwodnych rozpuszczalników lub rozpuszczalni-
ków o nieznacznej zawartości wody, to otrzymuje
się wyłącznie lub znacznie przeważająco jedną
z odmian, zwłaszcza odmianę -cis. I tak np. można
wytwarzać czystą odmianę -cis nie krystalizującego
lub słabo krystalizującego związku o wzorze 1, do-

dając acetonowy roztwór związku o wzorze 2 do wodnego roztworu związku o wzorze 3 w temperaturze od -30°C do $+20^{\circ}\text{C}$ i kilkakrotnie strącając po zakończonej reakcji.

Substraty o wzorze 2 można wprowadzać jako racemiczne izomery -cis i -trans (wytwarzanie jak wyżej), jako optycznie czynne odmiany -cis i -trans oraz jako ich mieszaniny. Optycznie czynne związki o wzorze 2 otrzymuje się np. z soli optycznie czynnych kwasów sulfonowych (wytwarzanie jak wyżej), hydrolizując je do odpowiednich optycznie czynnych 4-hydroksyoksazafosforyn o wzorze 2 (w wodzie np. w temperaturze $0-50^{\circ}\text{C}$, zwłaszcza w temperaturze $5-30^{\circ}\text{C}$) i utleniając uwolniony tiol o wzorze 3 do dwusiarczku (np. za pomocą jodu lub nadtlenku wodoru w wodzie. W dalszym sposobie postępowania jako substrat stosuje się np. oddzieloną optycznie czynną pochodną cyklofosfamid, czyli optycznie czynną pochodną cyklofosfamidu bis-(2-chloroetyloamino)-2-ketotetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforyny i hydrolizuje się ten związek na optycznie czynny 4-hydroksycyklofosfamid. W kolejnym sposobie np. optycznie czynny cyklofosfamid (ogłoszony opis Republiki Federalnej Niemiec nr 2944106) na drodze opisanej przez Peter'a i współpracowników w Cancer Treatment Reports 60, 429 (1976) poddaje się reakcji, otrzymując optycznie czynny 4-hydroksycyklofosfamid.

Dla rozszczępienia racematu wchodzi w rachubę jako optycznie czynne zasady np. 1-fenyletyloamina, brucyna, chinidyna, strychnina i cynchonina oraz dalsze zasady i metody, które opisano w Optical Resolution Procedures For Chemical Compounds, tom 2, Paul Newman, 1981, Verlage Optical Resolution Information Center in Riverdale, St. Zjedn. Am. Te optycznie czynne zasady można, zamiast zasad już podanych przy omawianiu symbolu Y^{\oplus} , stosować także podczas syntezy w reakcji związku o wzorze 2 ze związkiem o wzorze 3. W tym przypadku te optycznie czynne zasady w znany sposób należy wymienić następnie na wódór lub na zasadę objętą w wyżej podanym omówieniu symbolu Y^{\oplus} .

Alternatywny sposób wytwarzania nowych kwasów oksazafosforyno-4-tio-alkanosulfonowych i ich obojętnych soli, o wzorze 1, w którym wszystkie symbole mają znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1, polega według wynalazku na tym, że związek o wzorze 2, w którym R_1 , R_2 , R_3 i R_4 mają znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1, a Z oznacza atom wodoru lub rodnik alkilowy o 1-4 atomach węgla, poddaje się reakcji ze związkiem o ogólnym wzorze 3, w którym Y^{\oplus} oznacza kation, wywodzący się z optycznie czynnej zasady, innej niż zasady podane wyżej przy omawianiu symbolu Y^{\oplus} i po reakcji tę optycznie czynną zasadę wymienia się na atom wodoru lub na zasadę objętą w wyżej podanym omówieniu symbolu Y^{\oplus} .

Związki o wzorze 1, w którym Y^{\oplus} stanowi obok atomu wodoru zupełnie określone kationy, nadają się do stosowania farmakologicznego, i dlatego powinny wykazywać wysoki stopień czystości. Sens omówionej wyżej odmiany sposobu polega na tym, że najpierw tworzy się sól, nie będącą żądanym produktem końcowym, która nawet w obecności

zanieczyszczeń, ewentualnie powstałych podczas reakcji, łatwiej krystalizuje niż sole objęte wzorem 1. Tę, różniącą się od produktu końcowego, sól można ze względu na jej większą zdolność do krystalizacji, łatwiej oczyszczać, np. drogą przekrystalizowania. Po oddzieleniu zanieczyszczeń sól tak oczyszczoną poddaje się reakcji z zasadą objętą w omówieniu znaczeń symbolu Y^{\oplus} w produkcie końcowym, otrzymując łatwiej krystalizującą wobec braku zanieczyszczeń, żądaną sól o wzorze 1, charakteryzującą się wysokim stopniem czystości.

Związki wytworzone sposobem według wynalazku można stosować do zwalczania raka i do tłumienia odporności. Wykazują one silną czynność przeciwnowotworową. Oznaczają się one wysoką aktywnością po zaaplikowaniu pozajelitowym i dostnym oraz nieznacznymi objawami ogólnie toksycznymi. Wykazują one in vivo wysoką rakotoksyczną selektywność, a in vitro wykazują wysoką specyficzną cytotoksyczną.

W celu stwierdzenia działania rakotoksycznego zbadano te substancje w doświadczeniach na zwierzętach dla szeregu nowotworów o różnej chemiodporności. Dla oceny określono za pomocą analizy Probit'a z zależności między logarytmami dawek a kroćnościami leczonych i przeżywających zwierząt doświadczalnych średnią dawkę kuracyjnie skuteczną (DC 50 [mg/kg]). Jako substancje porównawczą, pod względem struktury chemicznej najbliższą nowym związkom wytworzonym sposobem według wynalazku, stosowano znany związek o nazwie handlowej Cyclophosphamid, czyli bis-(2-chloroetyloamino)-2-ketotetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforinę.

W przypadku limfatycznej białaczki L522 szczurów (rasy: ED IX) ta średnia dawka kuracyjna przy jednokrotnym dożylnym podaniu w 5-tym dniu po inokulacji białaczki wyniosła 1,5 mg/kg zarówno dla nowych związków wytworzonych sposobem według wynalazku jak i dla Cyclophosphamid'u.

W przypadku chemionadwrażliwego mięsakoraka z wodobrzuszem Yoshida (linia AH 13) szczurów (rasy: Sprague-Dawley) wartość DC 50 wyniosła 1 mg/kg zarówno dla nowych związków wytworzonych sposobem według wynalazku jak i dla substancji porównawczej, czyli dla Cyclophosphamid'u.

W analogiczny sposób zbadano działanie toksyczne, przy czym średnią dawkę śmiertelną (DL 50 [mg/kg]) określono z zależności logarytmów tych dawek i częstości zgonów.

Dla nowych związków wytworzonych sposobem według wynalazku wartość DL 50 po jednokrotnym podaniu dożylnym wynosi około 300 mg/kg. Porównawczo określona średnia dawka śmiertelna Cyclophosphamidu po jednokrotnym podaniu dożylnym wynosi 244 mg/kg. Zgodnie z tym nowe związki wykazują o około 20% mniejszą ostrą toksyczność lub odpowiednio szeroki zakres terapeutyczny przy jednakowej skuteczności kuracyjnej.

Dla zbadania cytotoksycznej specyficzności in vitro inkubowano każdorazowo około $3 \cdot 10^7$ sterylnie uzyskanych komórek chemiodpornego puchlinowego mięsakoraka Yoshida (linia AH13, szczep

ASTA) z rosnącymi stężeniami nowych związków w ciągu 2 godzin w temperaturze 37°C i po kilkukrotnym przemywaniu wszczepiano w jamie brzusznej nietraktowanych zwierząt-gospodarczych. Z zależności między logarytmami stężeń i krotnością rozwijających się nowotworów określano za pomocą analizy Probit'a średnią dawkę cytotoksyczną (CE 50 [$\mu\text{g/ml}$]). W tych warunkach badania wartość CE 50 dla nowych związków wynosiła 3–5 $\mu\text{g/ml}$.

Ponieważ Cyclophosphamid jako najpierw nieczynna transportowa postać związku nie wykazuje żadnej aktywności cytotoksycznej, toteż w badaniach tych jako substancję porównawczą stosowano czynny metabolit pierwotny, czyli 4-hydroksy-Cyclophosphamid, który w organizmie tworzy się drogą enzymatycznej aktywacji, głównie w wątrobie. Dla tej substancji porównawczej średnie stężenie cytotoksyczne wynosi również 5 $\mu\text{g/ml}$.

Podane niżej przykłady objaśniają bliżej sposób według wynalazku, nie ograniczając jego zakresu.

Przykład I. Sól cykloheksyloamoniowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-ketotetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

5,6 g (20 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamid (tj. 2-tlenku-2-[dwu-(2-chloroetylo)-amino]-4-hydroksy-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforyny) i 4,8 g (20 mmoli) 2-merkaptotanosulfonianu cykloheksyloamoniowego rozpuszcza się w 100 ml destylowanej wody, zadaje niewielką ilością kwasu trójchlorooctowego i pozostawia w ciągu 3 dni w temperaturze 0°C w chłodzarni. Następnie rozpuszczalnik odpędza się w wysokiej próżni, pozostałość rozpuszcza się w acetonie, ponownie zateża, krystalizuje z acetonem i przekryształizowuje z izopropanolem, otrzymując 7,2 g (72% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze 149–151°C (odmiana-cis).

Przykład II. Sól cykloheksyloamoniowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

2,9 g (10 mmoli) 2-tlenku 2-[dwu-(2-chloroetylo)-amino]-4-metoksy-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforyny i 2,4 g (10 mmoli) 2-merkaptotanosulfonianu cykloheksyloamoniowego rozpuszcza się razem z niewielką ilością kwasu trójchlorooctowego w 10 ml dwumetyloformamidu i utrzymuje w ciągu 20 godzin w temperaturze –25°C. Po dalszym pozostawieniu w ciągu 3 godzin w temperaturze 0°C zadaje się eterem aż do rozpoczynającego się zmętnienia, rozciera się, krystalizat odsąca się po 20-godzinny pozostawieniu w temperaturze 0°C, przemywa i suszy, otrzymując 4,7 g (94% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze 145°C (z rozkładem). Po przekryształizowaniu z układu alkohol/eter odmiana-cis- wykazuje temperaturę topnienia 149–151°C.

Przykład III. Sól cykloheksyloamoniowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

1,4 g (5 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamid i 1,2 g (5 mmoli) 2-merkaptotanosulfonianu cykloheksyloamoniowego rozpuszcza się ze śladowymi ilościami kwasu trójchlorooctowego w 25 ml metanolu i pozostawia w ciągu nocy w temperaturze –25°C w zamrażarce. Następnie roztwór reakcyjny zateża się do objętości około 5 ml, eter dodaje się aż do rozpoczynającego się zmętnienia i rozciera. Krystalizat odsąca się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa i suszy, otrzymując 2,1 g (84% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 143–145°C (odmiana-cis).

Przykład IV. Sól sodowa kwasu 2-[2-(dwu-(chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

2,5 g (5 mmoli) 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonianu cykloheksyloamoniowego rozpuszcza się w 25 ml wody nie zawierającej tlenu i wprowadza na kolumnę naładowaną jonami sodowymi kationitu firmy Merck. Eluat wylapuje się nad azotem, suszy przez wymrożenie, a stałą pozostałość suszy się nad pięciotlenkiem fosforu pod próżnią, otrzymując 1,9 g (91% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 78–83°C (z rozkładem) i o współczynniku $R_f=0,61$ (czynnik obiegowy: układ octan etylowy-izopropanol-1n kwas octowy = 5:3:2).

Przykład V. Sól amoniowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-ketotetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

2,8 g (10 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamid i 1,6 g (10 mmoli) 2-merkaptotanosulfonianu amoniowego razem z katalityczną ilością kwasu trójchlorooctowego rozpuszcza się w 50 ml wody i pozostawia w ciągu 3 dni w temperaturze 0°C w chłodzarni. Następnie wodę oddestylowuje się w wysokiej próżni, pozostałość dwukrotnie rozpuszcza się w acetonie i zateża pod próżnią, po czym przekryształizowuje z układu aceton/eter, otrzymując 3,9 g (95% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 131–133°C (odmiana-cis).

Przykład VI. Sól amoniowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

2,8 g (10 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamid i 1,6 g (10 mmoli) 2-merkaptotanosulfonianu amoniowego razem z katalityczną ilością kwasu trójchlorooctowego rozpuszcza się w 10 ml dwumetyloformamidu i utrzymuje w ciągu 20 godzin w temperaturze –25°C w zamrażarce. Po upływie dalszych 5 godzin w temperaturze 0°C zadaje się eterem do pojawiającego się zmętnienia i rozciera. Krystalizat po upływie 1 dnia w temperaturze 0°C odsąca się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa, suszy i przekryształizowuje z n-propanolem, otrzymując 3,2 g (77% wydajności teoretycznej) odmiany-cis, o temperaturze topnienia 132°C.

Przykład VII. Sól sodowa kwasu 3-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforylo-4-tio]-propanosulfonowego.

5,4 g (20 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamid i 5,2 g (20 mmoli) 3-merkaptopropanosulfonianu cyklo-

heksyloamoniowego rozpuszcza się w 100 ml wody, zadaje niewielką ilością kwasu trójchlorooctowego i pozostawia w ciągu 1 dnia w temperaturze 0°C. Następnie mieszaninę reakcyjną zateża się pod próżnią, zateżoną pozostałość wprowadza się na kolumnę z naładowanymi jodami sodowymi kationitem, eluat zateża się pod próżnią, pozostałość rozpuszcza się w bezwodnym etanolu, sączy i strąca eterem, otrzymując 5,5 g (63% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 75—79°C i o współczynniku $R_f=0,64$ (czynnik obiegowy: układ octan etylowy-izopropanol-1n kwas octowy = 5 : 3 : 2).

Przykład VIII. Sól sodowa kwasu 2-[2-(2-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

1,6 g (5 mmoli) 2-tlenku 2-[dwu-(2-chloroetylo)-amino]-4-etoksy-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforyny i 0,8 g (5 mmoli) 2-merkaptotanosulfonianu sodowego w 10 ml dwumetyloformamidu zadaje się śladową ilością kwasu trójchlorooctowego i utrzymuje w ciągu nocy w temperaturze -25°C. Następnie do roztworu reakcyjnego dodaje się 20 ml eteru. Pozostałość po 20-godzinym pozostawieniu w temperaturze 0°C odsąca się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa i suszy, otrzymując 1,5 g (71% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 145—150°C (z rozkładem) i o współczynniku $R_f=0,56$.

Przykład IX. Kwas 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

0,8 g (3,0 mmole) 4-hydroksycyklofosfamidu w 3 ml wody, chłodząc w wodzie z lodem, zadaje się 430 mg (3,0 mmole) kwasu 2-merkaptotanosulfonowego. Po upływie 1 godziny zateża się w wysokiej próżni i krystalizuje, otrzymując 1,1 g (92% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze 75—78°C.

Przykład X. Kwas 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowy.

2,0 g (4 mmole) 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4]-tioetanosulfonianu cykloheksyloamoniowego rozpuszcza się w niewielkiej ilości wody* i chłodząc do temperatury 4°C wprowadza się na kolumnę z wyładowanymi jonami wodorowymi kationitem. Eluat ten następnie suszy się przez wymrażanie i przekrystalizowuje z układu dwumetyloformamid/chloroform, otrzymując 1,2 g (75% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 75—78°C i o współczynniku $R_f=0,58$ [czynnik obiegowy: octan etylowy (izopropanol) 1 n kwas octowy = 5 : 3 : 2].

Przykład XI. Sól amoniowa kwasu 2-[2-(2-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,5,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

720 mg (1,8 mmola) kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4]-tioetanosulfonowego rozpuszcza się w małej ilości wody, zobojętnia amoniakiem i zadaje 4 ml acetonu. Roztwór reakcyjny pozostawia się w ciągu nocy w temperaturze -25°C. Krysta-

lizat odsąca się pod zmniejszonym ciśnieniem i przekrystalizowuje się z układu metanol/aceton, otrzymując 530 mg (71% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 133—134°C (odmiana-cis).

Przykład XII. Sól litowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

540 mg (2 mmola) 4-hydroksycyklofosfamidu i 500 mg (2 mmola) 2-merkaptotanosulfonianu litowego razem ze śladową ilością kwasu trójchlorooctowego rozpuszcza się w 7 ml wody i pozostawia w ciągu 20 godzin w temperaturze 0°C. Mieszaninę reakcyjną zateża się pod próżnią, pozostałość rozpuszcza się w acetonie i sączy. Następnie roztwór zateża się, pozostałość rozpuszcza się w etanolu, zateża, ponownie rozpuszcza w etanolu, strąca eterem, a osad odsąca się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa i suszy, otrzymując 500 mg (61% wydajności teoretycznej) produktu o współczynniku $R_f=0,56$ (czynnik obiegowy: octan etylowy-izopropanol-1n kwas octowy = 5 : 3 : 2).

Przykład XIII. obojętna sól magnezowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

1,4 g (5 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamidu i 750 mg (2,5 mmola) dwu-2-merkaptotanosulfonianu magnezowego razem z niewielką ilością kwasu trójchlorooctowego rozpuszcza się w 15 ml wody i po upływie 3 dni w temperaturze 0°C zateża się pod próżnią. Pozostałość tę rozpuszcza się w etanolu, zateża, ponownie rozpuszcza w etanolu, strąca eterem, odsąca pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa i suszy, otrzymując 1,3 g (63% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 110—115°C (z rozkładem) i o współczynniku $R_f=0,56$.

Przykład XIV. Obojętna sól wapniowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

1,4 g (5 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamidu i 800 mg (2,5 mmola) dwu-2-merkaptotanosulfonianu wapniowego razem z niewielką ilością kwasu trójchlorooctowego rozpuszcza się w 15 ml wody, po upływie 2 dni w temperaturze 0°C zateża się pod próżnią, dwukrotnie zadaje się etanolem, zateża, rozpuszcza w etanolu i strąca eterem, sączy pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa i suszy, otrzymując 1,3 g (62% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 110—115°C (z rozkładem) i o współczynniku $R_f=0,56$.

Przykład XV. Sól cykloheksyloamoniowa kwasu 2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-6-metylo-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

1,45 g (5 mmoli) 2-tlenku 2-[bis(2-chloroetylo)-amino]-4-hydroksy-6-metylo-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforyny i 1,2 g (5 mmoli) 2-merkaptotanosulfonianu cykloheksyloamoniowego rozpuszcza się w 5 ml wody i 5 ml acetonu, zakwasza kwasem trójchlorooctowym i pozostawia w ciągu 20 godzin w temperaturze 0°C. Następnie sączy się, przesącz ostrożnie zateża się pod próżnią, pozostałość dwu-

krotnie rozpuszcza się w acetonie i zateża. Otrzymaną pozostałość rozpuszcza się w acetonie, strąca eterem i suszy, otrzymując 1,4 g (56% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 120—125°C (z rozkładem) i o współczynniku $R_f=0,61$.

Przykład XVI. Sól sodowa kwasu 3-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-2-metylopropanosulfonowego.

277 mg (1 mmol) 4-hydroksycyklofosfamid i 192 mg (1 mmol) 3-merkaptosulfonianu sodowego rozpuszcza się w 4 ml wody, zadaje śladową ilość kwasu trójchlorooctowego i pozostawia w ciągu 20 godzin w temperaturze 0°C. Po zateżeniu pod próżnią pozostałość dwukrotnie rozpuszcza się w bezwodnym etanolu, ponownie zateża i strąca w układzie alkohol/eter, otrzymując 420 mg (86% wydajności teoretycznej) produktu o współczynniku $R_f=0,61$.

Przykład XVII. Sól sodowa kwasu 6-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-heksanosulfonowego.

277 g (1 mmol) 4-hydroksycyklofosfamid i 220 mg (1 mmol) 6-merkaptosulfonianu sodowego razem ze śladową ilością kwasu trójchlorooctowego rozpuszcza się w 4 ml wody i pozostawia w ciągu 20 godzin w temperaturze 0°C. Następnie mieszaninę reakcyjną łagodnie zateża się pod próżnią, pozostałość dwukrotnie rozpuszcza się w bezwodnym etanolu i ponownie zateża. Pozostałość tę rozpuszcza się w alkoholu i strąca eterem, otrzymując 350 mg (70% wydajności teoretycznej) produktu o współczynniku $R_f=0,58$.

Przykład XVIII. Sól cykloheksyloamoniowa kwasu 2-[3-(2-chloroetylo)-2-(2-chloroetyloamino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

277 mg (1 mmol) 2-tlenku-3-(2-chloroetylo)-2-(2-chloroetyloamino)-hydroksy-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforyny i 240 mg (1 mmol) 2-merkaptosulfonianu cykloheksyloamoniowego rozpuszcza się w 4 ml wody, zadaje śladową ilość kwasu trójchlorooctowego i utrzymuje w ciągu 20 godzin w temperaturze 0°C. Zateżony pod próżnią roztwór reakcyjny dwukrotnie rozpuszcza się w etanolu i ponownie zateża. Następnie rozpuszcza się w etanolu i strąca eterem, otrzymując 340 mg (68% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 115—120°C (z rozkładem) i o współczynniku $R_f=0,56$.

Przykład XIX. Sól cykloheksyloamoniowa kwasu 2-[3-(2-chloroetylo)-2-(dwu-(2-chloroetylo)-

-amino)-2-ketotetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

340 mg (1 mmol) 2-tlenku 3-(2-chloroetylo)-2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-4-hydroksy-tetrahydro-2H-1,3,2-oksaza fosforyny i 240 mg (1 mmol) 2-merkaptosulfonianu cykloheksyloamoniowego w 2 ml dwumetyloformamidu zadaje się śladową ilością kwasu trójchlorooctowego i w ciągu 2 dni przechowuje się w temperaturze -25°C. Następnie mieszaninę reakcyjną strąca się 20-krotną ilością eteru. Pozostałość przemywa się i suszy, otrzymując 400 mg (71% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 102—107°C (z rozkładem) i o współczynniku $R_f=0,63$.

Przykłady XX—XXX. Analogicznie jak w poprzednich przykładach wytwarza się oksazafosforyno-4-tio-alkanosulfoniany o wzorze 4, w którym wszystkie symbole mają znaczenie wyszczególnione w kolumnach niżej podanej tablicy, zawierającej także dane fizykochemiczne tych nowych związków, przy czym skrót roz. oznacza z rozkładem.

Przykład XXI. Sól cykloheksyloamoniowa kwasu 3-[2-(dwu(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-2-merkaptosulfonowego.

1,39 g (5 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamid i 1,44 g (5 mmoli) soli cykloheksyloamoniowej kwasu 2,3-dwumerkapto-propanosulfonowego rozpuszcza się w 10 ml etanolu, zakwasza kwasem trójchlorooctowym i pozostawia w ciągu 2 dni w temperaturze 0°C. Następnie strąca się eterem, po upływie 20 godzin zlewa się, a otrzymany jako pozostałość olej suszy się w wysokiej próżni, po czym olej ten krzepnie. Otrzymuje się 1,8 (77% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia od 70°C (z rozkładem).

Przykład XXXII. Sól sodowa kwasu cis-2-[2-(dwu-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-etanosulfonowego.

2,8 g (10 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamid w 10 ml acetonu zadaje się roztworem 1,3 g (8 mmoli) 2-merkaptosulfonianu sodowego w 2 ml wody i utrzymuje w ciągu 3 godzin w temperaturze 0°C. Następnie mieszaninę reakcyjną zateża się pod próżnią w temperaturze 25°C, pozostałość rozpuszcza się w bezwodnym acetonie i chłodząc zadaje bezwodnym eterem aż do pojawiającego się zmętnienia. Podczas zateżenia roztworu pod próżnią tworzy się osad. Otrzymuje się 1,5 g (44% wydajności teoretycznej) izomeru-cis o temperaturze topnienia 83—25°C. Na drodze przekrystalizowania

Tabela

Przykład	R ₁	R ₂	R ₃	Y [⊕]	Temperatura topnienia lub współczynnik R _f 1)
1	2	3	4	5	6
XX	Cl-CH ₂ -CH ₂	CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂	⊕ NH ₄	121—125° (roz.)
XXI	Cl-CH ₂ -CH ₂	CH ₂ -CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂	⊕ NH ₄	95—97°C (roz.)

1	2	3	4	5	6
XXII	CH ₃ -SO ₃ -CH ₂ - -CH ₂	CH ₃	Cl-CH ₂ -CH ₂	Wzór 5	0,64
XXIII	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	K [⊕]	120—123°C (roz.)
XXIV	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	Wzór 6	70—75°C (roz.)
XXV	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	CH ₃ -CH ₂) ₂ NH ₂ [⊕]	0,61
XXVI	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	HO-CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ [⊕]	0,59
XXVII	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	(HO-CH ₂ -CH ₂) ₂ NH ₂ [⊕]	0,59
XXXVIII	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	NH ₂) ₂ C=NH ₂ [⊕]	132—134°C
XXIX	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	(H ₃ N-CH ₂ -CH ₂ - -NH ₃) _{1/2} [⊕]	0,62
XXX	Cl-CH ₂ -CH ₂	Cl-CH ₂ -CH ₂	H	Wzór 7	0,61

1) Czynniki obiegowy: układ octan etylowy-izopropanol-in kwas octowy = 5:3:2.
Zabarwienie: m.in. za pomocą jodu.

w acetonie otrzymuje się produkt trudno rozpuszczalny w acetonie.

Przykład XXXIII. Sól guanidyniowa kwasu 3-[2-(dwo-(2-chloroetylo)-amino)-2-keto-tetrahydro-2H-1,3,2-oksazafosforynylo-4-tio]-propanosulfonowego.

14 g (50 mmoli) 4-hydroksycyklofosfamidu i 11 g (50 mmoli) soli guanidyniowej kwasu 3-merkaptopropanosulfonowego rozpuszcza się w 100 ml etanolu, zakwasza się kwasem trójchloroocetowym i utrzymuje w tej temperaturze 0°C. Po upływie 20 godzin dodaje się do całości 50 ml eteru. Krystalizat po upływie dalszych 20 godzin odsąca się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa i suszy, otrzymując 18,5 g (78% wydajności teoretycznej) produktu o temperaturze topnienia 128—132°C (z rozkładem).

Zastrzeżenia patentowe

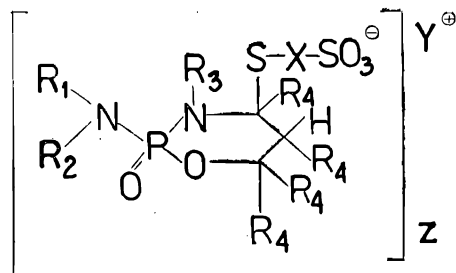
1. Sposób wytwarzania nowych kwasów oksazofosforyno-4-tio-alkanosulfonowych i ich obojętnych soli o ogólnym wzorze 1, w którym R₁, R₂ i R₃ stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają atom wodoru, rodnik metylowy, etylowy, 2-chloroetylowy lub 2-metanosulfonyloksyetylowy i co najmniej dwa z tych symboli R₁, R₂ i R₃ stanowią rodnik 2-chloroetylowy lub 2-metanosulfonyloksyetylowy, R₄ oznacza atom wodoru lub rodnik metylowy, X oznacza prostołańcuchowy lub rozgałęziony rodnik alkilenowy o 2—6 atomach węgla, ewentualnie podstawiony grupą merkaptu przy atomie węgla zajmującym położenie -1, -2, -3, -4 lub -5 w łańcuchu alkilenowym, a Y[⊕] oznacza kation wodorowy, kation metalu alkalicznego lub metalu ziem alkalicznych, kation guanidyniowy, morfoliniowy lub cykloheksyloamoniowy lub kation wywodzący się z aminy NR₅R₆R₇, w której R₅, R₆ i R₇ stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają atomy wodoru, grupy alkilowe o 1—2 atomach węgla lub grupy hydroksyetylowe, albo w którym Y[⊕] oznacza kation etyleno-
[⊕]
dwuamoniowy H₃N-CH₂CH₂-NH₃ lub kation piperazoniowy i z stanowi liczbę 1, jeżeli Y[⊕] jest kationem jednozasadowym, lub z stanowi liczbę 2, jeżeli Y[⊕] jest kationem dwuzasadowym lub katio-

nem związku o dwóch kationach jednozasadowych, **znamienny tym**, że oksazofosforynę o ogólnym wzorze 2, w którym R₁, R₂, R₃ i R₄ mają wyżej podane znaczenie, a Z oznacza atom wodoru lub rodnik alkilowy o 1—4 atomach węgla, poddaje się reakcji ze związkiem o ogólnym wzorze 3, w którym X i Y[⊕] mają wyżej podane znaczenie i w przypadku gdy Y[⊕] oznacza wodór, ewentualnie zobojętnia się otrzymany kwas oksazofosforyno-4-tioalkanosulfonowy zasadą odpowiadającą innemu znaczeniu symbolu Y[⊕] niż H[⊕].

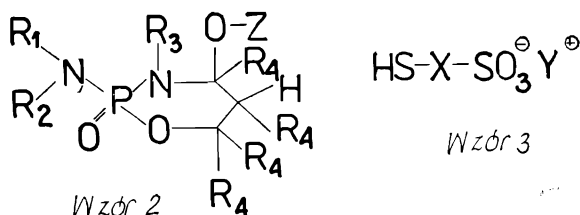
2. Sposób wytwarzania nowych kwasów oksazofosforyno-4-tioalkanosulfonowych i ich obojętnych soli o ogólnym wzorze 1, w którym R₁, R₂ i R₃ stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają atom wodoru, rodnik metylowy, etylowy, 2-chloroetylowy lub 2-metanosulfonyloksyetylowy i co najmniej dwa z tych symboli R₁, R₂ i R₃ stanowią rodnik 2-chloroetylowy lub 2-metanosulfonyloksyetylowy, R₄ oznacza atom wodoru lub rodnik metylowy, X oznacza prostołańcuchowy lub rozgałęziony rodnik alkilenowy o 2—6 atomach węgla, ewentualnie podstawiony grupą merkaptu przy atomie węgla zajmującym położenie -1, -2, -3, -4 lub -5 w łańcuchu alkilenowym, a Y[⊕] oznacza kation wodorowy, kation metalu alkalicznego lub metalu ziem alkalicznych, kation guanidyniowy, morfoliniowy lub cykloheksyloamoniowy lub kation wywodzący się z aminy NR₅R₆R₇, w której R₅, R₆ i R₇ stanowią jednakowe lub różne podstawniki i oznaczają atomy wodoru, grupy alkilowe o 1—2 atomach węgla lub grupę hydroksyetylowe, albo w którym Y[⊕] oznacza kation etylenodwuamoniowy H₃N[⊕]-CH₂CH₂-NH₃ lub kation piperazoniowy i z stanowi liczbę 1, jeżeli Y[⊕] jest kationem jednozasadowym, lub z stanowi liczbę 2, jeżeli Y[⊕] jest kationem dwuzasadowym lub kationem związku o dwóch kationach jednozasadowych, **znamienny tym**, że związek o wzorze 2, w którym R₁, R₂, R₃ i R₄ mają wyżej podane znaczenie, a Z oznacza atom wodoru lub rodnik alkilowy o 1—4 atomach węgla, poddaje się reakcji ze związkiem o ogólnym wzorze 3, w którym Y[⊕] oznacza kation, wywodzący się z optycznie czynnej zasady, innej niż zasady podane wyżej przy omawianiu symbolu Y[⊕], i po

reakcji tę optycznie czynną zasadę wymienia się na atom wodoru lub na zasadę obojętną w wyżej podanym omówieniu symbolu Y^{\ominus} .

3. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że kation Y^{\oplus} oksazafosforyno-4-tioalkanosulfonianu wymienia się na jonicie na inny kation Y^{\oplus} .

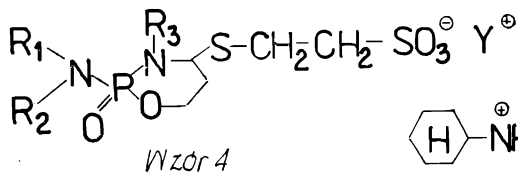


Wzór 1



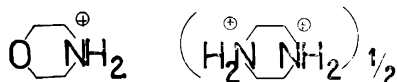
Wzór 2

Wzór 3

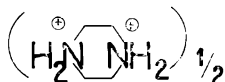


Wzór 4

Wzór 5



Wzór 6



Wzór 7