



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

252502
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 D 277/62

(22) Prihlášené 12 03 84
(21) [PV 1724-84]

(40) Zverejnené 18 12 86

(45) Vydané 15 10 88

(75)

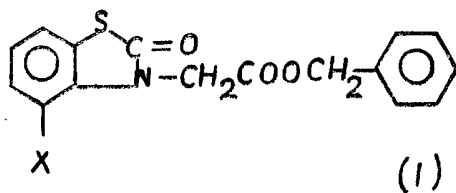
Autor vynálezu

SUTORIS VIKTOR prof. RNDr. CSc., MIKULÁŠEK SLAVOJ doc. ing. CSc.,
SEKERKA VLADIMÍR doc. RNDr. CSc., KONEČNÝ VÁCLAV RNDr. CSc.,
BRATISLAVA

(54) 4-X-3-benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolíny a spôsob ich prípravy

1

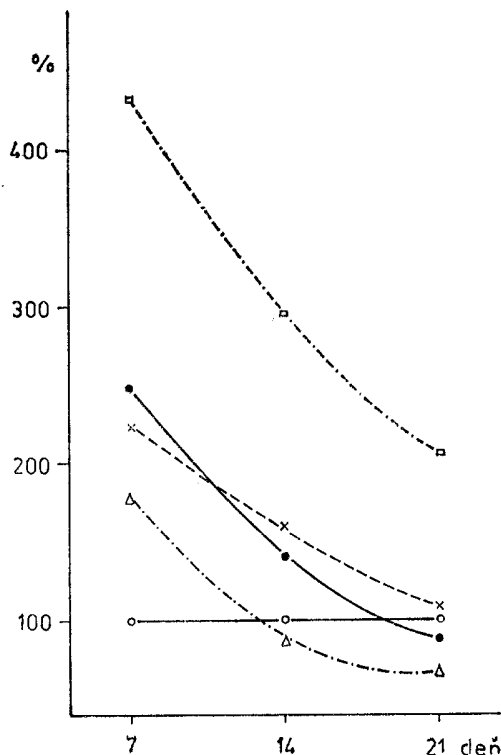
Rieši sa spôsob prípravy nových látok 4-X-3-benzyloxykarbonyl-metyl-2-oxobenzotiazolínov všeobecného vzorca I



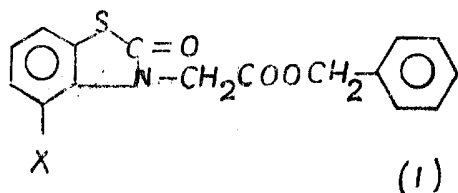
kde

X znamená vodík alebo chlór. Podstata spôsobu prípravy látok podľa vynálezu spočíva v tom, že deriváty 4-X-2-oxobenzotiazolínu, kde X znamená to isté ako vo vzorci I, reagujú s $YCH_2COOCH_2C_6H_5$, kde Y znamená chlór alebo bróm v prostredí organických rozpúšťadiel, ako sú nižšie alifatické alkoholy, ketóny a tetrahydrofurán pri teplote 60 až 80 °C po dobu 2 až 6 hodín za prítomnosti trietylamínu, trietylamínu a jodidu draselného, hydroxidu draselného alebo hydroxidu draselného a jodidu draselného.

2



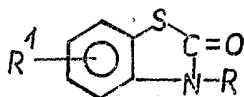
Vynález sa týka 4-X-3-benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolínov obecného vzorca I



kde

X znamená vodík, chlór a spôsobu ich prípravy. 3-Benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolín a 4-chlór-3-benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolín sú účinné na dediferenčnú transformáciu rastlinného organizmu.

Doterajšie syntézy rôzne substituovaných 2-oxobenzotiazolínov boli predovšetkým orientované na ich praktické využitie v oblasti pesticídov. Našli uplatnenie ako regulátory rastu [D'Amico J. J.: USA pat. 4 371 388 (1893); Chem. abstr. 99,22454 (1983); D'Amico J. J.: USA pat. 4 171 213 (1979); Chem. abstr. 92, 58764 (1983); D'Amico J. J.: USA pat. 4 187 097 (1977), Eur. pat. 2613 (1979). Chem. abstr. 92, 419 332 (1983); Ueda I.: jap. pat. 92956 (1979); Chem. abstr. 92, 94383 (1983); jap. pat. 105 605 (1980); Chem. abstr. 93, 216 681 (1983), obecného vzorca,

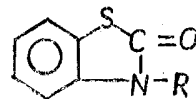


$R^1 = \text{H},$
halogén,
 $\text{NO}_2,$
alkyl,
 $\text{CF}_3,$
alkoxy,

$R = \text{alkyl},$
 $(\text{CH}_2)_n\text{OOCR}^2,$
 $(\text{CH}_2)_n\text{OCNHN}(\text{R}^2)_2,$
 $(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{OR}^2) = \text{NH} \cdot \text{HX},$
 $(\text{CH}_2)_n\text{OSCSR}^2,$
 $(\text{CH}_2)_n\text{OCC-morfolino},$
 $(\text{CH}_2)_n\text{N}^+(\text{R})_3\text{X}^-,$
 $(\text{CH}_2)_n(\text{COOOCR}^2) = \text{NH}$
 $n = 1 \text{ až } 4;$
 $\text{R}^2 = \text{alkyl}$

ako fungicídy predovšetkým 4-substituova-

né-3-metyl(etyl)-2-oxobenzotiazolín [Jap. pat. 9040 546 (1977); ZSSR pat. 713 523 (1978); D'Amico, J. J. Europ. pat. 7 772 (1980); Chem. abstr. 93, 150241 (1983); Jap. pat. 7 9032 787 (1977); ZSSR pat. 668 567 (1978); Veľ. Brit. pat. 1564 182 (1978); NSR pat. 2846 980 (1978), tiež ako prostriedky na zvyšovanie obsahu cukru v rastlinách produkujúcich cukor (D'Amico J. J.: USA pat. 576 512 (1975) obecného vzorca

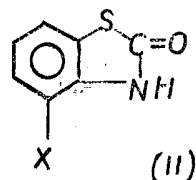


$R = \text{CH}_2\text{CN},$
 $(\text{CH}_2)_3\text{CN},$
 $\text{CH}_2\text{COOCH}_3,$
 $\text{CH}(\text{COOCH}_3)_2,$
 $\text{CH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2,$
 $\text{CH}_2\text{COOH},$
 CH_2CONH_2

a tiež ako herbicíd [Sohler E; Seidler L.; Vaňo J.; Šplháček R.; Fedor E.: Čsl. pat. 172 118 (1974)].

4-X-3-Benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolín podľa vynálezu nie sú v literatúre doteraz popísané.

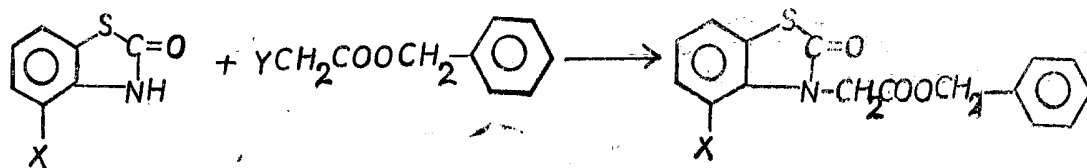
Podstata spôsobu prípravy látok podľa vynálezu spočíva v tom, že deriváty 4-X-2-oxobenzotiazolínov vzorca II



kde

X znamená to isté, ako vo vzorci I, reagujú s $\text{YCH}_2\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, kde

X znamená chlór alebo bróm v prostredí organických rozpúšťadiel, ako sú nižšie alifatické alkoholy, ketóny a tetrahydrofuran pri teplote 60 až 80 stupňov Celzia, po dobu 2 až 6 hodín za prítomnosti trietylamínu, trietylamínu a jodidu draselného, hydroxidu draselného alebo hydroxidu draselného a jodidu draselného. Uvedenú reakciu naznačuje nasledovná schéma:



kde

X a Y je horeuvedené.

Postupy alkylácie 4-X-2-oxobenzotiazolínov

Príklad 1

V 80 ml etylalkoholu sa rozpustilo za tepla 5,6 g (0,1 mólu) hydroxidu draselného a 15,1 g (0,1 mólu) 2-hydroxybenzotiazolu. Počas miešania sa prikvapkalo 18,4 g (15 ml, 0,1 mólu) benzylesteru chlór-octovej kyseliny. Potom sa reakčná zmes zahrieva 6 hodín na teplotu 90 stupňov Celzia vo vodnom kúpeli. Po ochladení sa reakčná zmes vyliala na ľad, surový produkt sa izoloval a kryštalizoval z 80 %-ného etanolu alebo metanolu. T. t. 99 až 102 stupňov Celzia, výťažok 19 g (63 %).

Príklad 2

Do roztoku 15,1 g (0,1 mólu) 2-hydroxybenzotiazolu v 100 ml acetónu alebo tetrahydrofuránu sa pridalo 10,1 g (14 ml, 0,1 mólu) trietylaminu a 16,6 g (0,1 mólu) jodidu dra-

selného. Počas miešania sa prikvapkávalo 18,4 g (15 ml, 0,1 mólu) benzylesteru chlór-octovej kyseliny a potom sa reakčná zmes zahrieva na teplotu 60 stupňov Celzia 2 hodiny vo vodnom kúpeli. Po vylíati na rozdrvený ľad, surový produkt sa izoloval a kryštalizoval z 80 %-ného etanolu alebo metanolu. T. t. 100 až 102 stupňov Celzia, výťažok 25,4 g (85 %).

Príklad 3

V 80 ml etylalkoholu alebo metylalkoholu sa rozpustilo za tepla 5,6 g (0,1 mólu) hydroxidu draselného a 15,1 g (0,1 mólu) jodidu draselného a za miešania sa po častiach pridalo 18,4 g (15 ml, 0,1 mólu) benzylesteru chlór-octovej kyseliny alebo 22,9 g (0,1 mólu) benzylesteru bróm-octovej kyseliny. Zmes sa zahrieva 2 hodiny na teplotu varu a po ochladení vyliala na rozdrvený ľad. Kryštalizácia z 80 %-ného etylalkoholu. Výťažok 23,4 g (78,4 %. T. t. 100 až 102 °C).

$C_{16}H_{15}NO_3S$ M. h. 299,35

Analýza:	% C	% H	% N	% S
Vypočítané:	64,19	4,37	4,67	10,71
Zistené:	64,08	4,33	4,62	10,85

1H NMR 3-benzyl-oxycarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolínu:

4,85 (NCH₂, s, 2H),
5,14 (COOCH₂, s, 2H),
7—7,7 (ar, m, 9H).

Rozpustnosť:

metylalkohol,
etylalkohol,
acetón,
benzén,
dimetylformamid,
dimetylsulfoxid.

Príklad 4

18,5 g (0,1 mólu) 2-hydroxy-4-chlórbenzotiazolu sa za tepla rozpustilo v 150 ml acetónu alebo tetrahydrofuránu, pridalo sa 10,1 g (14 ml, 0,1 mólu) trietylaminu a počas intenzívneho miešania sa prikvapkalo 18,4 gramu (15 ml, 0,1 mólu) benzylesteru chlór-octovej kyseliny. Reakčná zmes sa potom zahrieva na teplotu varu 4 hodiny vo vodnom kúpeli. Po vylíati na ľad sa produkt kryštalizoval z 80 %-ného etylalkoholu alebo metylalkoholu. T. t. 140 až 142 °C, výťažok 21,6 g (65 %).

Príklad 5

Do roztoku 18,5 g (0,1 mólu) 2-hydroxy-4-chlórbenzotiazolu v 150 ml acetónu sa pridalo 10,1 g (14 ml, 0,1 mólu) trietylaminu a 16,6 g (0,1 mólu) jodidu draselného. V priebehu intenzívneho miešania sa prikvapkalo 18,4 g (15 ml, 0,1 mólu) benzylesteru chlór-octovej kyseliny a potom sa reakčná zmes 4 hodiny zahrieva na teplotu 60 až 70 °C. Po ochladení reakčná zmes vyliala na ľad a izolovaný produkt kryštalizovaný z 80 %-ného etanolu. T. t. 139 až 142 °C, výťažok 30 g (90 %).

Príklad 6

V 100 ml etylalkoholu alebo metylalkoholu sa rozpustilo za tepla 5,6 g (0,1 mólu) hydroxidu draselného a 18,5 g (0,1 mólu) 2-hydroxy-4-chlórbenzotiazolu. Potom sa pridalo 16,6 g (0,1 mólu) jodidu draselného a v priebehu intenzívneho miešania sa prikvapkalo 18,4 g (15 ml, 0,1 mólu) benzylesteru chlór-octovej kyseliny, alebo 22,9 g (0,1 mólu) benzylesteru bróm-octovej kyseliny. Reakčná zmes sa zahrieva 4 hodiny na 80 °C. Po vylíati na ľad produkt kryštalizovaný z 80 %-ného etylalkoholu. T. t. 139 až 142 °C, výťažok 26,8 g (80,6 %).

$C_{16}H_{12}ClNO_3S$ M. h. 333,79

Analýza:	% C	% H	% N	% S	% Cl
Vypočítané:	57,57	3,62	4,19	9,60	10,62
Zistené:	57,68	3,64	4,28	9,46	10,59

^1H NMR 4-chlór-3-benzyloxykarbonylmetyl-
-2-oxo-benzotiazolínu:

5,10 (NCH₂, s, 2H),
5,16 (COOCH₂, s, 2H),
7—7,7 (ar, m, 8H).

m-multiplet,
s-singlet

rozpuštnosť:

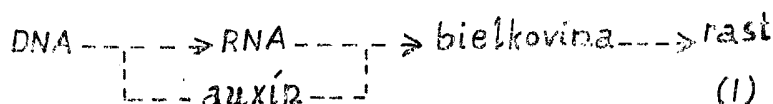
metylalkohol,
etylalkohol
benzén,
acetón
dimetylsulfoxid,
dimetylformamid.

^1H NMR spektrá boli namerané na prístroji TESLA BS 487 A 80 MHz v deuterovanom dimetylsulfoxide so štandardom hexametyldisiloxánom.

Chemické regulátory rastu a delenia s vysokou biologickou aktivitou a selektivitou majú dnes vedúcu úlohu v usmernenej regulácii životne dôležitých procesov rastlinného organizmu. Používajú sa na zvyšovanie výnosnosti rastlín (Šebánek, J.: Sborník VŠZ, Brno, 2, 322, 1965; Nátr, L., Kousalová, I.: Studijní informace — základní a pomocné vědy v zemědělství. ÚVTI, Praha, 1973; Kutná, J.: Regulátory růstu a její využití v zemědělství a zahradnictví, SZN, Praha, 1977)

a pri štúdiu diferenciácie a dediferenciácie rastlinných buniek, pletív a orgánov v podmienkach „In vivo“ a „In vitro“ (Thimann, K. V.: The auxins. In: Wilkins, M. B.: The Physiology of Plant Growth and Development. Mc Graw-Hill, London, p. 3, 1969; Gamborg, K. Z.: Biochimija auxina i jeho dejství na kletky rasteníj. Nauka, 272, 1976; Reinert, J. Bajaj, Y.P.S.: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, p-803, 1977). Mechanizmus pôsobenia fytohormonálnych látok na integrujúce životné pochody — rast a transformáciu rastlinného organizmu uvádzajú viacerí autori. Kefeli V. I.: Rast rasteníj. Moskva. Kolos. 1973, p-120, predpokladá, že do riadenia každého fyziologického procesu je zapojený celý rad fytohormónov. Auxíny pôsobia na posun iónovej rovnováhy síl, aktivujú syntézu m-RNA, stimulujú syntézu enzýmov, modifikujú zloženie bunkových stien, ich zmäknutie a rozťahovanie bunky v dôsledku odvápnenia bunkových stien. Gibberelíny pôsobia na syntézu nových RNA v jadre, syntézu bielkovín, enzýmov a aktivujú rast bunky. Cytokiníny bezprostredne vplyvajú na syntézu m-RNA a syntézu enzýmov, aktivujú rast bunky a aktivujú t-RNA.

Súčasnne znalosti mechanizmu pôsobenia fytohormónov poukazujú na to, že ich hlavný účinok je v oblasti genetického kódu, kde pôsobia ako derepresory a represory syntézy enzýmov, tým zasahujú do prenosu genetickej informácie v transkripčnom a translakčnom procese podľa schémy:



(I)

alebo pôsobia epigeneticky, tým, že modifikujú produkt proteosyntézy podľa schémy:



(II)

(Gamborg Z. K., Biochimija auxina i jeho dejství na kletky rasteníj. Izd. Nauka, 1976, p-271). Iná predstava (Butenko R. G., Experimentálny morfogeneza i diferenciácia v kultúre kletok rasteníj; In: 35 ježegod. Timirjazev. čtenie. Nauka, pp 3.1975) predpokladá, že fytohormonálne látky aktivujú proliferáciu diferencovaných buniek v transformačnom procese nasledovným mechanizmom: vplyvom regulátorov zvyšuje sa prie-

puštnosť bunkových štruktúr, menia sa ich vlastnosti. Potom nasleduje aktivácia syntézy cytoplazmatických bielkovín, ktoré sú transportované do jadra, špecificky sa viažu s histónmi, respresujú lokusy zodpovedné za syntézu r-RNA a t-RNA. Replikácia DNA sa začína len po dosiahnutí určitej prahovej úrovne RNA v bunke. To postačuje, aby sa bunka začala deliť.

Podstata spôsobu usmernenej dediferenciačnej transformácie buniek a pletív rastlinného organizmu „In vivo“ a „In vitro“ spočíva v tom, že na rastlinný materiál sa pôsobí 3-benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolínom alebo 4-chlór-3-benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolínom. Preukazná tiazolínom alebo 4-chlór-3-benzyloxykarbo- stáva po pôsobení látky v koncentrácii 10^{-4} až 10^{-3} mol. dm $^{-3}$. Viditeľne je inhibovaný prešľovací rast stonky a primárneho koreňa. Pletivá hrubnú v prolongačnej zóne. Morfózy sa objavujú na apexoch stonky a koreňa, na ktorom diferencujú bočné korene. Následkom rýchlejšieho rastu vnútornej časti pletív dochádza k roztrhnutiu povrchových vrstiev apexu, dediferenciačnej a prolongačnej zóny a k tzv. „vyzlečeniu koreňa“, oddeleniu povrchových kortikálnych vrstiev od vnútornej stržňovej časti bunky, ktorej intenzívne proliferujú. V obnaženej dediferenciačnej zóne následkom inhibície rastu primárneho koreňa bočné korene vyrastajú husto vedľa seba a vytvárajú pilkovité, alebo vejárovité morfózne útvary s typickou teratoidnou formou organizácie.

Amorfne kalusy vznikajú dediferenciáciou v podmienkach „In vitro“. V štádiu primokalusu pletivo je rozpadavé na bunky. Po preočkovaní na čerstvé médium, analogického zloženia, ako bolo médium počas dediferenciačie klasu, zachováva typický neorganizovaný rast. Po aplikácii predmetných látok na kalusové bunky čerstvá hmotnosť biomas-y počas pretrvávajúcej dediferenciačie sa zvyšuje, v závislosti na koncentrácii a čase pôsobenia látky s maximom účinnosti pri koncentrácii 10^{-5} mol. dm $^{-3}$. Zlúčeniny aplikované podľa vynálezu spôsobujú morfogénne procesy a morfológické efekty známe účinnosťou hormonálnych efektorov a to v podmienkach „In vivo“ a „In vitro“.

Stupeň účinnosti predmetných látok závisí od použitej koncentrácie. Uvedené biologické účinky zvyčajne výrazujú význam 3-benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolínu a 4-chlór-3-benzyloxykarbonylmetyl-2-oxobenzotiazolínu ako potencionálnych induktorov usmernenej dediferenciačnej transformácie organizmu, pletív a buniek rastlín za účelom biotechnologických manipulácií.

Príklad 7

V prvej sérii pokusov v podmienkach „In vitro“ k indukciu dediferenciačie boli použité klíčence rastlín (*Vicia sativa* L. var. *Fatima*; *Vicia faba* L. var. *Inovec*; *Pisum sativum* L. var. *Smaragd*). Po inhibícii (6–16 hod.) v destilovanej vode semená klíčili v expandovanom perlite, v tme v termostate 72 hod. Potom boli klíčence po omytí od perlitu osušené papierovou vatou, selektované a na ďalšie testy boli použité klíčence s koreňom dlhým 25–30 mm $\pm$ 1 mm. Súborné klíčencov (5 kusov) boli vysadené v horizontálnej polohe na navlhčený filtračný pa-

pier do Petriho misiek priemernej veľkosti 17 cm. Filtračný papier bol nasýtený účinnou látkou v koncentráciách 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} a 10^{-9} mol. dm $^{-3}$. Kontrolovaná séria klíčencov bola inkubovaná na filtračnom papieri, ktorý bol nasýtený destilovanou vodou. Indukcia dediferenciačie sa uskutočnila v termostate v tme pri 25 °C $\pm$ 1 °C počas 72 až 96 hodín. Efekt dediferenciačnej transformácie bol stanovený vizuálne pomocou mikroskopického lupy. Maximálnu dediferenciačnú účinnosť spôsobuje skúmaná látka na klíčencoch rastlín po pôsobení látok v koncentráciách 10^{-4} a 10^{-3} mol. dm $^{-3}$.

Príklad 8

V druhej sérii pokusov v podmienkach „In vitro“ kalogenéza bola indukovaná na apikálnych segmentoch primárnych koreňov viki siatej (*Vicia sativa* L. var. *Solarka*). Selektované semená (približne rovnakej veľkosti a farby osemenia) boli sterilizované roztokom 5 % chloramínu 1 hodinu a niekoľkokrát opláchnuté sterilnou destilovanou vodou. Sterilné semená klíčili v Petriho miskách na 0,8 % v agarovom médiu 48 hodín v tme pri 25 °C $\pm$ 1 °C. K indukciu kalogenézy boli použité sterilné klíčence 25–30 milimetrov $\pm$ 1 mm dlhé. Z nich boli dekapitované apikálne segmenty primárnych koreňov v dĺžke 10 – 15 mm, ktoré boli vysadené do Petriho misiek v horizontálnej polohe na 0,6 % modifikované pevné agarovo médium podľa Murashige-Skooga. V pokusných variantoch médium obsahovalo účinnú látku v koncentrácii 10^{-2} až 10^{-9} mol. dm $^{-3}$. V kontrolnej variante médium obsahovalo 2,4-D v koncentrácii 10^{-5} mol. dm $^{-3}$. Kalogenéza bola indukovaná pri teplote 25 °C, v tme počas 14 dní. Príprava skúmaného materiálu ako aj kultivácia boli robené v aseptických podmienkach. Maximálna dediferenciačná účinnosť bola zistená pri koncentrácii $5 \cdot 10^{-4}$ mol. dm $^{-3}$.

Príklad 9

V tretej sérii pokusov bol zistený účinok látok na tvorbu čerstvej hmotnosti kalusového pletiva *Haplopappus gracilis*. Ako inokulum bol použitý kalus z kultúry nachádzajúcej sa v 53 pasáži, pestovanej na pevnom agarovom médiu podľa Murashige-Skooga. Počiatočná hmotnosť inokula sa pohybovala od 1,1 – 2,3 g $^{-1}$. V pokusnej sérii inokulum bolo vysadené do 100 ml Erlenmeyerových baniek na pevné agarovo médium podľa Murashige-Skooga s obsahom účinnej látky 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-3} mol. dm $^{-3}$ v jednotlivých variantoch. Kontrolná séria obsahovala ako fytoormonálny efektor 2,4-D v koncentrácii 10^{-5} mol. dm $^{-3}$. Kultivácia prebiehala v termostate v tme pri teplote 25 °C. Odbery vzoriek boli robené na 7., 14., a 21.

deň kultivácie, v 10. opakovaníach. Gravi-
metricky bola vyhodnotená produkcia čerst-
vej hmotnosti. (Vid' graf). Maximálny nárast
čerstvej hmotnosti bol dosiahnutý po pôso-
bení účinnou látkou v koncentrácii 10^{-5} mol.
dm⁻³. 4-Cl-3-benzyloxykaronylmetyl-2-oxo-
benzotiazolín preukázal rovnakú účinnosť.

Skúmané látky spôsobujú analogické mor-
fogénne procesy a morfológické efekty ako
fytohormóny a to v podmienkach „In vivo“
a „In vitro“. Čerstvá hmotnosť biomasy po
pôsobení účinnou látkou na kalusové bunky
sa zvyšuje v závislosti na koncentrácii a ča-
se pôsobenia látky s maximom účinnosti pri
koncentrácii 10^{-5} mol. dm⁻³.

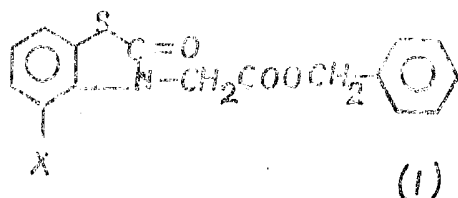
Legenda ku grafu:

Prírastok čerstvej hmotnosti kalusov vply-
vom rôznych koncentrácií 3-benzyloxykarbo-
nylmetyl-2-oxobenzotiazolínu.

○	kontrola
△	roztok 10^{-3} mol. l ⁻¹
□	roztok 10^{-5} mol. l ⁻¹
●	roztok 10^{-6} mol. l ⁻¹
×	roztok 10^{-7} mol. l ⁻¹

PREDMET VYNÁLEZU

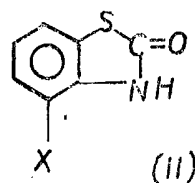
1. 4-X-3-Benzyloxykarbonylmetyl-2-oxoben-
zotiazolíny obecného vzorca I



kde

X znamená vodík alebo chlór.

2. Spôsob prípravy látok podľa bodu 1
vyznačený tým, že deriváty 4-X-2-oxobenzo-
tiazolínu vzorca II



kde

X znamená to isté ako vo vzorci I, reagujú
s látkou vzorca (II)



kde

Y znamená chlór alebo bróm, v prostredí
organických rozpúšťadiel ako sú alifatické
alkoholy, ketóny, a tetrahydrofurán pri tep-
lote 60 až 80 °C, po dobu 2 až 6 hodín za
prítomnosti trietylamínu alebo trietylamí-
nu a jodidu draselného alebo hydroxidu
draselného alebo hydroxidu draselného a
jodidu draselného.

