

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2020-276

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/34 (2006.01)
A01N 43/90 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

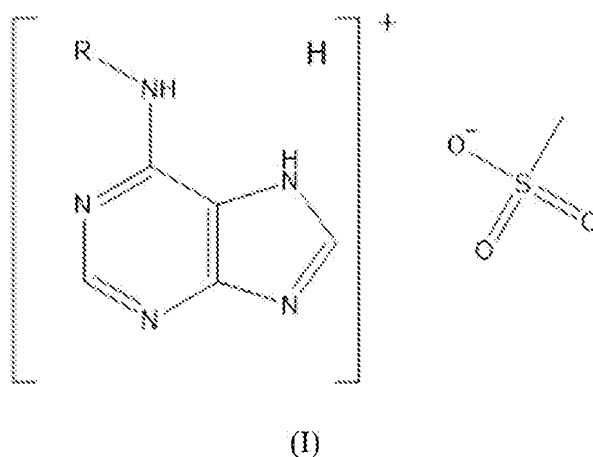


ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.05.2020**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **24.11.2021**
(Věstník č. 47/2021)

- (71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
- (72) Původce:
Bc. Dardan Klos, Bernartice nad Odrou, CZ
doc. Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D., Olomouc,
Nemilany, CZ
RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D., Šumperk, CZ
Mgr. Karel Doležal, Dr.DSc., Hlubočky, CZ
Ing. Radoslav Kopma, Ph.D., Olomouc, Klášterní
Hradisko, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc,
Neředín, CZ
Mgr. Jan Walla, Olomouc, Nová Ulice, CZ
Jarmila Balonová, Velká Bystřice, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice



- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Mesylátové soli heterocyklických
cytokininů, přípravky obsahující tyto
deriváty a jejich použití**

- (57) Anotace:
Předmětem předkládaného vynálezu jsou mesyláty heterocyklických cytokininů obecného vzorce I, kde R je vybrán ze skupiny obsahující C3-C15 cykloalkyl, furfuryl, allyl, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl, 3-methylbut-2-en-1-yl, 4-hydroxy-3-methylbutyl, 4-hydroxy-1,3-dimethylbut-2-en-1-yl, 4-hydroxy-1,3-dimethylbutyl, benzyl; kde cykloalkyl, allyl, benzyl a furfuryl mohou být nesubstituovány nebo volitelně substituovány 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny obsahující hydroxy, halogen, methyl, hydroxymethyl a methoxy. Tyto sloučeniny jsou vhodné zejména pro zemědělské a biotechnologické využití, a jejich velkou výhodou je zvýšená vodorozpuštěnost oproti volným bázím heterocyklických cytokininů.

Mesylátové soli heterocyklických cytokininů, přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká mesylátových solí heterocyklických cytokininů, jejich použití v zemědělství a v biotechnologických aplikacích, a přípravků obsahujících tyto deriváty.

10

Dosavadní stav techniky

Cytokinin (CKs) jsou adeninové deriváty obsahující různé substituenty připojené na atomu N⁶ heterocyklické molekuly adeninu. V závislosti na struktuře postranního řetězce je rozdělujeme na
 15 dvě skupiny a nazýváme je isoprenoidní nebo aromatické CKs. Isoprenoidní cytokinin jsou skupinou, která se v přirozených podmínkách vyskytuje častěji. Hlavní představitelé isoprenoidních cytokininů jsou N⁶-isopentenyladenin (iP) a jeho hydroxylovaná forma *trans*-zeatin (tZ). Oba zmiňované isoprenoidní CKs jsou považovány za aktivní, vzhledem k silné vazbě na cytokininové receptory v *Arabidopsis* (Inoue et al., 2001, Nature 409, 1060-1063). Zeatin existuje
 20 také jako *cis*-isomer (cZ), který vykazuje nižší cytokininovou aktivitu (Spíchal et al., 2004, FEBS Journal 276, 244–253.), ale je přirozeně se vyskytujícím CK v rostlinách (Gajdošová et al., 2011, J Exp Bot 62, 2827 – 2840). Nasycení dvojné vazby v isoprenoidním řetězci zeatinu může vést ke vzniku dihydrozeatinu (DHZ), který vykazuje nižší biologickou aktivitu ve tkáňových kulturách než zeatin (Letham, 1963, Life Sci, 8:569-573).

25

Kromě volných bází, které jsou aktivními formami cytokininů v rostlinách, se CKs také vyskytují v přírodním materiálu jako ribosidy (v nichž je ribóza připojena zpravidla na atom N9 purinového skeletu) a ribotidy (v nichž ribóza ještě obsahuje fosfátovou skupinu v poloze 5'). Cytokinin jsou rostlinně-specifické chemické přenašeče informací (fytormony), které hrají ústřední roli
 30 v regulaci rostlinného buněčného cyklu a v mnoha dalších růstových a vývojových procesech.

Po objevu hydroxylovaných aromatických cytokininů topolinů, jako přirozeně se vyskytujících cytokininů (Strnad 1997, Physiol Plant 101, 674-688), se tyto nové látky začaly uplatňovat namísto
 35 dlouho používaných cytokininů, například 6-benzylaminopurinu (BAP), *trans*-zeatinu (tZ) anebo kinetinu (K) v rostlinných tkáňových kulturách (RTK) jako vhodná alternativa. Celosvětově se v posledních patnácti letech používají topoliny a jejich deriváty ve výzkumných laboratořích. Topoliny, zejména *meta*-topolin a jeho deriváty, jsou využívány k iniciaci kultury výhonů a pupenů, při optimalizacích mikropopagačních protokolů a pro potlačení různých *in vitro* vyvolaných fyziologických poruch (např. hyperhydricita, nekróza vzrostných vrcholů, tvorba
 40 chimér, inhibice tvorby kořenů během aklimatizace a časná senescence) u mnoha různých druhů rostlin pěstovaných v *in vitro* kultuře. Mnoho studií svědčí o rostoucí popularitě a výhodách (ačkoliv ne univerzálně pro všechny rostlinné druhy) topolinů v porovnání s jinými CKs (Adeyemi et al. 2012, Plant Tissue Organ Cult. 108: 1-16.). Cytokinin jsou bohužel prakticky nerozpustné ve vodě, ačkoliv mají vysokou permeabilitu buněčnou membránou. Nízká rozpustnost ve vodě a
 45 pomalá rychlost rozpouštění jsou pak často limitujícími faktory odpovědnými za nízkou biodostupnost těchto sloučenin, což limituje jejich aplikační možnosti. Navzdory dlouho známému faktu, že cytokinin mají schopnosti regulovat růst a vývoj rostlin, nebyly zatím implementovány téměř žádné jednoduché technologie ošetření rostlin. Jedním z přijatelných vysvětlení je právě špatná rozpustnost a špatná biologická dostupnost, jakož i rychlý metabolismus cytokininů v jejich
 50 známých formách.

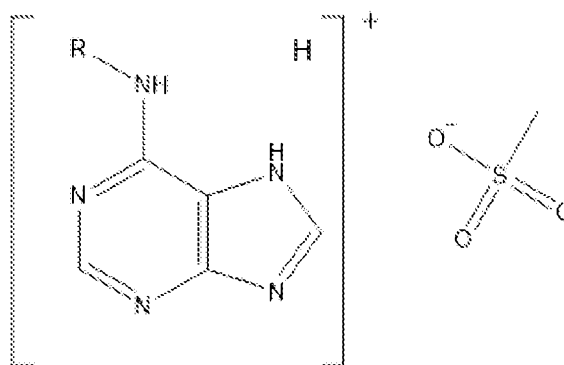
Soli aktivních látek mohou existovat v různých fyzikálních formách včetně amorfních a krystalických forem. Zatímco amorfní formy sestávají z neuspořádaného uspořádání molekul, krystalické formy mají molekuly uloženy s periodicky opakovanou strukturou v konkrétní
 55 krystalové mřížce. Pokud pevná látka existuje ve dvou nebo více krystalových formách, které mají

odlišné rozložení a/nebo konformaci molekuly v krystalové mřížce, říkáme, že vykazují polymorfismus a rozdílné krystalové formy jsou nazývány polymorfy. Polymorfy pevných látek mohou mít odlišné fyzikální charakteristiky a chemické chování v pevné fázi (například reaktivitu). Polymorfy se liší ve své vnitřní struktuře (uspořádání), a proto mají odlišné fyzikální a chemické vlastnosti, například tzv. crystal packing, termodynamiku, spektroskopická data, kinetiku, interfaciální a mechanické vlastnosti. Tyto vlastnosti mohou mít dopad na vlastnosti, kvalitu nebo účinnost produktu, včetně stability, rozpustnosti nebo biodostupnosti. Příprava amorfních forem v průmyslovém měřítku je často problematická. Mnoho procesů používaných k přípravě tzv. aktivních farmaceutických ingrediencí (API), zejména pak krystalických, není vhodných pro použití v průmyslovém měřítku.

Krystalizaci nových cytokininových solí, tzn. nových pevných forem dané sloučeniny, mohou být dosaženy unikátní vlastnosti v porovnání s existujícími pevnými formami cytokininů nebo jejich stávajících popsanych solí. Krystalografické a spektroskopické vlastnosti konkrétních forem jsou kromě jiných technik klasicky stanovovány za pomoci rentgenové práškové difrakce (XRPD) a monokrystalové rentgenové difrakce. Konkrétní krystalické formy často vykazují odlišné termické vlastnosti, například odlišný bod tání.

20 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou mesyláty (mesylátové soli) N⁶-substituovaných adeninových derivátů obecného vzorce I,



25

(I)

kde R je vybrán ze skupiny obsahující C3-C15 cykloalkyl, furfuryl, allyl, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl, 3-methylbut-2-en-1-yl, 4-hydroxy-3-methylbutyl, 4-hydroxy-1,3-dimethylbut-2-en-1-yl, 4-hydroxy-1,3-dimethylbutyl, benzyl, kde cykloalkyl, allyl, benzyl a furfuryl mohou být nesubstituovány nebo volitelně substituovány 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny obsahující hydroxy, halogen, methyl, hydroxymethyl a methoxy.

Mesyláty heterocyklických cytokininů obecného vzorce I podle tohoto vynálezu také zahrnují případné opticky aktivní izomery a jejich směsi včetně racemátů.

V celé specifikaci, pokud z kontextu nevyplývá jinak, názvy substituentů mají následující význam:

Halogen znamená radikál fluoru, bromu, chloru nebo jódu;
 Hydroxyl znamená skupinu -OH;
 Methyl znamená skupinu -CH₃;
 Methoxy znamená skupinu -OCH₃;

Hydroxymethyl znamená skupinu HO-CH₂-;

C3-C15 cykloalkyl znamená mono- nebo polycyklickou alkylovou skupinu sestávající ze 3 až 15-ti uhlíkových atomů (s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, cykloheptyl a adamantyl).

Výhodně jsou sloučeniny obecného vzorce I vybrané ze skupiny zahrnující:

6-(2-hydroxycyklopropylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxycyklobutylamino)purin mesylát, 6-(3-methoxycyklobutylamino)purin mesylát, 6-(3-methoxycyklopentylamino)purin mesylát, 6-cyklohexylaminopurin mesylát, 6-(3-hydroxycyklohexylamino)purin mesylát, 6-(3-methoxycyklohexylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxyfurfurylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxyfurfurylamino)purin mesylát, 6-(5-hydroxyfurfurylamino)purin mesylát, 6-(3-methoxyfurfurylamino)purin mesylát, 6-(4-methoxyfurfurylamino)purin mesylát, 6-(5-methoxyfurfurylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-3-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-5-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxy-5-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-3-jodbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-5-jodbenzylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-5-jodbenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxy-5-jodbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-3-brombenzylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-brombenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxy-5-brombenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-3-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-5-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxy-5-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2,3-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2,4-dihydroxy-3-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2,5-dihydroxy-4-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxy-5-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxy-4-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-2-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(4-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2,3-dimethoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2,4-dimethoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2,5-dimethoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3,4-dimethoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2,3,4-trimethoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2,3,5-trimethoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-allylaminopurin mesylát, 6-isopentenylaminopurin mesylát, 6-(3,3-dimethylallylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxymethyl-3-methylallylamino)purin mesylát, 6-(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(Z)-(1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(E)-(1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-methylbutylamino)purin mesylát, and 6-(1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbutylamino)purin mesylát.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou heterocyklické cytokininové mesyláty obecného vzorce I vybrané ze skupiny zahrnující 6-furfurylaminopurin mesylát, 6-(2-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(3-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(3-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(4-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-benzylaminopurin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(Z)-(4-hydroxy-1,3-dimethylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(E)-(4-hydroxy-1,3-dimethylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-methylbutylamino)purin mesylát a 6-(4-hydroxy-1,3-dimethylbutylamino)purin mesylát.

V jednom aspektu vynálezu jsou předmětem vynálezu krystalické mesyláty N⁶-substituovaných

adeninových derivátů obecného vzorce I.

S výhodou je předmětem vynálezu krystalický benzylaminopurin mesylát mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 6.2; 10.0; 15.2; 15.7; 18.6; 18.8; 19.3; 20.4; 23.5; 23.8; 24.4; 27.6 $\pm$ 0.2° 2-theta.

S výhodou je předmětem vynálezu krystalický meta-topolin mesylát ((3-hydroxybenzylamino)purin mesylát) mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 8.1; 9.7; 13.1; 15.6; 16.8; 17.6; 19.1; 19.5; 22.2; 24.6; 24.8; 24.9; 25.7 $\pm$ 0.2° 2-theta.

S výhodou je předmětem vynálezu krystalický ortho-topolin mesylát ((2-hydroxybenzylamino)purin mesylát) mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 9.8; 12.1; 16.8; 17.8; 18.3; 18.3; 20.7; 23.3; 24.1; 25.1; 26.8 $\pm$ 0.2° 2-theta.

S výhodou je předmětem vynálezu krystalický kinetin mesylát (furfurylaminopurin mesylát) mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 6.2; 18.9; 19.8; 20.4; 22.6; 23.9; 27.7; 27.8 $\pm$ 0.2° 2-theta.

Mesylátové soli vzorce I se obecně připraví reakcí báze (N6-substituovaného adeninového derivátu) a methylsulfonové kyseliny v polárním rozpouštědle, zejména C1-C4 alkoholu, nejvýhodněji v methanolu. Krystalizace se pak provádí s výhodou z acetonu.

Mesylátové soli purinových cytokininů vzorce I, a zejména jejich krystalické formy, mají zlepšené fyzikálně-chemické vlastnosti, a to zejména lepší rozpustnost v polárních rozpouštědlech včetně vody, vyšší stabilitu a biodostupnost, a snazší průmyslovou přípravu těchto látek.

Cytokininové mesyláty obecného vzorce I podle předkládaného vynálezu mají širokou škálu biologických aktivit, včetně antioxidační, anti-senescentní, podporující nakládání floému, ovlivnění tvorby nadzemní části rostliny i kořene, pro-diferenciační aktivity, které jsou zvláště užitečné v zemědělských a biotechnologických aplikacích (např. k ošetření rostlinných pletiv a buněk). Jejich velkou výhodou, zvyšující i jejich biologické aktivity, je zvýšená rozpustnost ve vodě a biodostupnost. Sloučeniny dle předkládaného vynálezu (a přípravky je obsahující) mají minimální nebo nulovou toxicitu. To umožňuje jejich použití v širokém rozsahu aplikací.

Předmětem vynálezu je použití sloučenin obecného vzorce I pro ochranu rostlinných buněk *in vivo* a *in vitro* proti oxidativnímu a elektrofilnímu stresu.

Předmětem vynálezu je také použití sloučenin obecného vzorce I jako antioxidantů pro inhibici lipidové, proteinové a DNA peroxidace v rostlinách *in vivo* nebo *in vitro*.

Tento vynález se dále týká použití cytokininových mesylátů obecného vzorce I pro zvýšení výnosu, zlepšení zakořeňování, zvýšení počtu odnoží, zvýšení multiplikace a oddálení senescence v produkci užitkových rostlin a zemědělských plodin, zejména obilovin (pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, žito, oves, čirok a příbuzné druhy), řepy (cukrové a krmné řepy), malvic, peckovic a drobného (měkkého) ovoce (jablka, hrušky, švestky, broskve, mandle, třešně, jahody, borůvky), luštěnin (fazole, čočka, hrách, soja), olejovin (řepka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokos, Ricinus, kakaové plody, arašidy), tykvovitých (okurky, dýně, melouny), vláknitých rostlin (bavlna, len, konopí, juta), citrusů (pomeranče, citróny, grepy, mandarinky), zeleniny (špenát, skořicovník, kafr) nebo rostlin jako tabák, ořechy, lilek, cukrová třpina, čaj, vinná réva, chmel, banány a přírodní kaučuk a léčivé rostliny, stejně jako okrasné rostliny. Plodiny zahrnují takové rostliny, které se ukázaly tolerantní vůči různým skupinám růstových regulátorů/faktorů při použití konvenčních šlechtitelských metod nebo při metodách genetického inženýrství.

Předmětem vynálezu je také použití sloučenin obecného vzorce I jako růstově-regulační a prodiferenciační faktory. Mohou být využity k optimalizaci podmínek v rostlinné tkáňové kultuře *in vitro*. Konkrétně pro *in vitro* zahrnují somatickou embryogenezi, mikropropagaci, androgenezi, gynogenezi, suspenzní a protoplastové kultury. Sloučeniny dle předkládaného vynálezu mohou být
5 take použity jako inhibitory růstu kořene v rostlinné tkáňové kultuře.

Cytokininové mesyláty obecného vzorce I mohou být podle předkládaného vynálezu dále využity v rostlinných tkáňových kulturách k potlačení nežádoucích fyziologických poruch, jako jsou např. hyperhydricita, nekróza vzrostných vrcholů, tvorba chimér, inhibice tvorby kořenů během
10 aklimatizace a časná senescence.

Předmětem vynálezu je použití sloučeniny obecného vzorce I jako růstového regulátoru v rostlinných tkáňových kulturách ke stimulaci proliferace a morfogeneze.

15 Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučenin obecného vzorce I jako růstové regulátory při klonování rostlinných i živočišných zárodečných buněk a embryí, s výhodou oocytů.

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučenin obecného vzorce I pro inhibici nebo oddálení senescence rostlinných buněk a celých rostlin.
20

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučenin obecného vzorce I v zemědělství a v biotechnologiích pro inhibici, oddálení nebo redukci nepříznivých efektů souvisejících se senescencí, a to jak *in vivo* tak *in vitro*, tato použití také zahrnují zlepšení celkového vzhledu a kondice rostlin, konkrétně rostlinných epidermálních a mezofylových buněk, a také pro inhibici,
25 oddálení nebo redukci senescence, žloutnutí, ztráty chloroplastů a/nebo chlorofylu.

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučenin obecného vzorce I pro omlazení rostlinných buněk a/nebo stimulaci buněčné proliferace a/nebo jejich diferenciaci v organismu.

30 Výše uvedená použití sloučenin obecného vzorce I obvykle zahrnují aplikaci účinného množství alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I na buňky (např. v tkáňové kultuře), rostlinné orgány, části rostlin nebo na celé rostliny. Sloučeniny vzorce I lze aplikovat samotné, nebo – obvykleji – v podobě přípravku s rozpouštědly, nosiči a/nebo pomocnými látkami.

35 Vynález dále zahrnuje zemědělské a biotechnologické přípravky obsahující nejméně jeden cytokininový mesylát obecného vzorce I a vhodný nosič. Sloučeniny podle obecného vzorce I jsou použity v nezměněné formě nebo výhodně společně s pomocnými látkami, běžně používanými pro formulaci přípravků. Za tímto účelem jsou přípravky výhodně formulovány jako koncentráty, účinné látky, jakož i suspenze a disperse, s výhodou izotonické vodné roztoky, zředěné emulze,
40 rozpustné prášky, granuláty, krémy, gely, olejové suspenze a take obalované formulace, např. polymerními látkami. Stejně jako u typu přípravku, způsoby aplikace, jako je postřik, rozprašování, práškování, rozptýl, natírání nebo zalévání, se volí v souladu se zamýšlenými cíli a převažujícími okolnostmi. Přípravky mohou být sterilizovány a/nebo mohou obsahovat další pomocné látky neutrální povahy, jako jsou konzervační činidla, stabilizátory, smáčedla nebo emulgátory,
45 solubilizační činidla, stejně jako hnojiva, donory stopových prvků nebo jiných prostředků k dosažení speciálních efektů.

Cytokininové mesyláty podle obecného vzorce I mohou být smíseny s jinými růstově regulačními látkami (růstovými regulátory), hnojivy a pesticidy, což může vést k synergické aktivitě.
50

V tomto textu termín *in vivo* znamená použití v živé celé rostlině nebo části rostliny schopné samostatného života. Termín *in vitro* znamená v buňce, v organele nebo v odebrané části rostliny, nebo v uspořádání zahrnujícím pouze funkční sloučeniny z rostlin či zvířat, jako jsou enzymy či látky pro přenos informací v buňce.
55

PŘÍPRAVKY

Přípravky obsahující sloučeninu vzorce obecného I (aktivní složka) a pokud je třeba, jednu nebo více pevných nebo kapalných pomocných látek jsou připraveny známými způsoby, například smísením nebo mletím účinné látky s pomocnými látkami, jako jsou např. rozpouštědla nebo pevné nosiče. Do přípravků mohou být přidávány povrchově aktivní látky (surfaktanty) a smáčedla.

Příklady vhodných aniontových, neiontových a kationtových smáčedel jsou shrnuty například ve WO 97/34485.

Také vhodné pro přípravu kompozic, které obsahují sloučeninu vzorce I jsou povrchově aktivní látky běžně používané při formulaci prostředků, které jsou popsány např. v "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual" MC Publishing Corp., Ridgewood New Jersey, 1981; Stache, H., "Tensid-Taschenbuch", Carl Hanser Verlag, Munich, 1981; a M. a J. Ash, "Encyclopedia of Surfactants", Vol.1-3, Chemical Publishing Co., New York, 1980-81.

Formulace přípravku obsahuje váhově od 0.1 do 99 % (w/w), zejména pak od 0.1 do 95% (w/w) aktivní složky cytokininového mesylátu, přičemž obsahuje váhově smáčedlo a to od 0.1 do 25%.

Ačkoliv jsou komerční produkty obvykle připravovány ve formě koncentrátů, konečný uživatel upotřebí naředěný přípravek. Kompozice může proto obsahovat i další přísady, jakými jsou stabilizátory, např. rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný palmový olej, řepkový olej nebo sojový olej), odpěňovače, např. silikonový olej, konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla nebo emulgátory, viskozitní činidla, pojiva, lepidla, a také hnojiva a další aktivní přísady. S výhodou jsou používány přípravky následujícího složení (% - hmotnostní procento).

Emulgované koncentráty:

Aktivní složka:	1 až 90 %, s výhodou 5 až 20 %
smáčedlo:	1 až 30 %, s výhodou 10 až 20 %
kapalný nosič:	5 až 94 %, s výhodou 70 až 85 %

Prášky:

Aktivní složka:	0.1 až 10 %, s výhodou 0.1 až 5 %
Pevný nosič:	99.9 až 90 %, s výhodou 99.9 až 95 %

Suspenní koncentráty:

Aktivní složka:	5 až 75 %, s výhodou 10 až 50 %
voda:	94 až 24 %, s výhodou 88 až 30 %
smáčedlo:	1 až 40 %, s výhodou 2 až 30 %

Smáčivé prášky:

Aktivní složka:	0.5 až 90 %, s výhodou 1 až 80 %
Smáčedlo:	0.5 až 20 %, s výhodou 1 až 15 %
Pevný nosič:	5 až 95 %, s výhodou 15 až 90 %

Granule:

Aktivní látka:	0.1 až 30 %, s výhodou 0.1 až 15 %
Pevný nosič:	99.9 až 70 %, s výhodou 99.9 až 85 %

Pro použití sloučenin vzorce I nebo kompozic je obsahujících se používají rozdílné metody a technologie, kterými jsou například následující:

Kompozice mohou rovněž obsahovat další příměsi, jakými jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidizované rostlinné oleje (epoxidizovaný kokosový olej, řepkový olej nebo sojový olej), odpěňovače, např. silikonový olej, konzervační látky, regulátory viskozity, pojiva, zahušťovadla, a také hnojiva a další aktivní látky. Pro použití sloučenin obecného vzorce I nebo jejich solí, nebo kompozic je obsahujících, se používají rozdílné metody a technologie, kterými jsou například následující:

i) *Obalování osiva*

a) Obalování osiva smáčivou práškovou formulací sloučeninu vzorce I, a to mícháním v nádobě až do stejnorodé distribuce na povrchu semen (suché obalování). V tomto případě se použije 1 až 500 g sloučeniny podle obecného vzorce I (4 g až 2 kg smáčivého prášku) na 100 kg semen.

b) Obalování osiva emulzifikovaným koncentrátem sloučeniny podle obecného vzorce I v souladu s metodou a) (mokré obalování)

c) Obalování osiva cestou máčení semen po dobu 1 až 72 h v tekutině obsahující od 100 do 1000 ppm sloučeniny podle obecného vzorce I s výhodou následného usušení semen (imersní obalování)

Obalování semen nebo ošetřování klíčících semenáčků je přirozeně preferovanou metodou aplikace, jelikož ošetření aktivní látkou je směřováno a cílí na plodiny. Obecně je sloučenina vzorce I používána v množství 1 až 1000 g, s výhodou od 5 do 250 g na 100 kg semen, avšak v závislosti na metodice, která rovněž umožňuje přidání dalších aktivních látek nebo mikroživin, určené koncentrační limity se mohou pohybovat nahoru nebo dolů (opakované obalování).

ii) *Aplikace cisternové směsi i postřikem*

Kapalná formulace je aplikována samotná nebo ve směsi s dalším růstovým regulátorem postřikem na rostliny, v množství od 0,05 g do 0,5 kg sloučeniny vzorce I na hektar. Taková cisternová aplikace se provádí před anebo po seti, zejména na vzešlé rostliny (listová aplikace) v množství postřikové jichy nebo smáčedla 100 – 600 l/ha v závislosti na druhu plodiny.

iii) *Aplikace do semenné brázdy*

Sloučenina dle obecného vzorce I je zavedená do otevřené brázdy oseté semenem ve formě emulzifikovaného koncentrátu, smáčivého prášku nebo granulí. Jakmile je semenná brázda zaklopena, je růstový regulator aplikován cestou obvykle používanou při pre-emergentním procesu.

iv) *Kontrolované uvolňování aktivních látek*

Sloučenina/ny vzorce I jsou aplikovány v roztoku k minerálním granulovaným nosičům nebo polymerizovaným granulím (močovina, formaldehyd) a jsou vysušeny. Jestliže je to žádoucí, je možné také aplikovat obalování, které umožňuje postupné uvolňování látky v měřitelných množstvích po určitou specifickou dobu (obalované granule).

Objasnění výkresů

Obr. 1 ukazuje srovnání XRPD difraktogramů BAP mesylátu krystalické soli s BAP.

Obr. 2 ukazuje srovnání XRPD difraktogramů krystalické soli *meta*-topolin mesylátu a *meta*-topolinu.

Obr. 3 ukazuje srovnání XRPD difraktogramů krystalické soli *ortho*-topolin mesylátu a *ortho*-

topolinu.

Obr. 4 ukazuje molekulární strukturu krystalické soli *meta*-topolinu mesylátu získanou za pomoci monokrystalové rentgeno-strukturní analýzy, včetně sítě intermolekulárních vodíkových vazeb

Obr. 5 ukazuje molekulární strukturu krystalické soli *ortho*-topolinu mesylátu získanou za pomoci monokrystalové rentgenostrukturní analýzy včetně sítě intermolekulárních vodíkových vazeb

Obr. 6 ukazuje XRPD difraktogram krystalické soli *meta*-topolin mesylátu jeden měsíc po uskladnění v pevném stavu

Příklady provedení vynálezu

- Následující příklady slouží k ilustraci vynálezu bez omezení jeho rozsahu. Pokud není uvedeno jinak, všechna procenta a podobná množství jsou založena na hmotnosti.

Příklad 1 Příprava krystalické soli *meta*-topolin [6-(3-hydroxybenzylamino)purin] mesylátu

- 6-(3-hydroxybenzylamino)purin (*meta*-topolin volná báze, 241 mg; 1 mmol) byl suspendován v methanolu (10 ml) při laboratorní teplotě a byla přidána po kapkách methansulfonová kyselina (100 mg; 1.03 mmol). Po krátkém čase reakční směs změnila barvu z čiré (bílé) i strukturu na nažloutlý roztok. Výsledná reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 20 min a pak odpařena na vakuové rotační odparce do vzniku nažloutlého pevného rezidua, který byl smíchán s 10 ml heptanu a po zfiltrování a promytí heptanem (3 x 5 ml) byl získán nažloutlý krystalický prášek, který byl vysušen do konstantní hmotnosti při 60 °C.

Výtěžek: 88 %; čistota (HPLC-UV/VIS): 98 %+; ESI-MS: $[M + H]^+ = 338.5$

- Průsvitné bílé krystaly vhodné pro provedení monokrystalové rtg difrakce za účelem stanovení molekulové struktury a práškové difrakce byly připraveny rozpuštěním výše uvedené látky v metanolu po sedmidenním stání a volném vypařování rozpouštědla.

Příklad 2: Příprava krystalické soli *ortho*-topolin [6-(2-hydroxybenzylamino)purinu] mesylátu

- 6-(2-hydroxybenzylamino)purin (*ortho*-topolin volná báze, 241 mg, 1 mmol) byl suspendován a míchán v methanolu (15 ml) při laboratorní teplotě a byla přidána po kapkách methansulfonová kyselina (100 mg, 1.03 mmol). Výsledná směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 30 min a pak odpařena na vakuové odparce do vzniku bílé pevné látky, do které byl vlit hexan (10 ml) – byla získána bílá krystalická látka. Produkt byl zfiltrován promyt hexanem (3x5 ml) a vysušen při 60 °C do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 310 mg (92 %); čistota (HPLC-UV/VIS): 99 %+; ESI-MS: $[M + H]^+ = 338.51$. Průsvitné bílé jehličkovité krystaly vhodné pro monokrystalovou rentgenostrukturní analýzu a práškovou difrakci byly připraveny rozpuštěním pevné látky v metanolu po sedmidenním volném odpařování rozpouštědla.

Příklad 3: Příprava krystalické soli 6-benzylaminopurinu mesylátu

- 500 mg 6-benzylaminopurinu bylo rozpuštěno v methanolu při 50 °C po dobu 30 min. Poté, co byl BAP zcela rozpuštěn byla přidána po kapkách metansulfonová kyselina (144 µl). Roztok byl hodinu refluxován, pak ochlazen na laboratorní teplotu a přemístěn do kádinky opatřené parafilmem. Roztok byl ponechán ke krystalizaci volným odpařováním rozpouštědla po dobu 7 dnů. Krystalická látka byla zfiltrována a promyta ledovým metanolem. Výtěžek: 86 %, čistota (HPLC-UV/VIS): 98 %, ESI-MS: $[M + H]^+ = 322.11$. Malé bílé krystalky vhodné pro práškovou difrakci byly připraveny rozpuštěním výše uvedené látky v metanolu a krystalizací substance při

7 °C po dobu sedmi dnů.

Příklad 4: Příprava krystalické soli 6-furfuryladeninu (kinetinu) mesylátu

- 5 500 mg 6-furfuryladeninu (kinetinu) bylo rozpuštěno v 50 ml metanolu při 50°C po dobu 30 min.

Po úplném rozpuštění kinetinu bylo do směsi přidáno 158 µl kyseliny metansulfonové po kapkách. Roztok byl následně hodinu refluxován, pak zchlazen na laboratorní teplotou a ponechán k volnému odpařování rozpouštědla v kádince zakryté parafilmem. Po sedmi dnech stání při teplotě 7 °C byla krystalická látka zfiltrována a promyta ledovým methanolem. Výtěžek: 85 %, čistota (HPLC-UV/VIS): 98 %, ESI-MS: $[M + H]^+ = 312.11$. Malé číré krystaly vhodné pro XRPD
10 práškovou difrakci byly připraveny opětovným rozpuštěním pevné látky v methanolu a volným odpařováním rozpouštědla po dobu 6 dnů při 7 °C.

- 15 **Příklad 5: Příprava krystalické soli (E)-zeatin (*trans*-zeatin) mesylátu ((E)-4-((9H-purin-6-ylamino)-2-methylbut-2-en-1-ol) methansulfonátu)**

(E)-zeatin (219 mg; 1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (25 ml) a k roztoku byla přidána po kapkách kyselina methasulfonová (100 mg; 1,03 mmol). Roztok byl míchán 20 minut za laboratorní teploty a poté zahuštěn na rotační vakuové odparce na pevný žlutobílý odparek, který
20 byl vymíchán v acetonu (10 ml) za lab. teploty. Bílý krystalický produkt byl odfiltrován, promyt acetonem (3 x 5 ml) a vysušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek: (255 mg; 81 %).

Čistota (HPLC-UV/VIS): 98 % +, ESI-MS: $[M + H]^+ = 220.11$

25

Příklad 6: Příprava krystalické soli (Z)-zeatin (*cis*-zeatin) mesylátu ((Z)-4-((9H-purin-6-ylamino)-2-methylbut-2-en-1-ol) methansulfonátu)

Přípraven identickým postupem jako (E) - isomer (viz příklad 5). Výtěžek: 240 mg; 76 %. Čistota (HPLC-UV/VIS): 98 % +, ESI-MS: $[M + H]^+ = 220.11$

30

Příklad 7: Příprava krystalické soli RS-(+/-)-dihydrozeatin mesylátu ((RS)-4-((9H-purin-6-ylamino)-2-methylbutan-1-ol) methansulfonátu)

35 RS-(+/-)-dihydrozeatin (221 mg; 1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (20 ml) a k roztoku byla přidána po kapkách kyselina methasulfonová (100 mg; 1,03 mmol). Roztok byl míchán 30 minut za laboratorní teploty a poté zahuštěn na rotační vakuové odparce na pevný téměř bílý odparek, který byl vymíchán v acetonu (10 ml) za lab. teploty. Bílý krystalický produkt byl odfiltrován, promyt acetonem (3 x 5 ml) a diethyletherem (2 x 5 ml) a vysušen do konstantní hmotnosti.
40 Výtěžek: 260 mg (82 %). Čistota (HPLC-UV/VIS): 98 % +, ESI-MS: $[M + H]^+ = 222.13$

Příklad 8: Příprava krystalické soli isopentenyladenin mesylátu (N-3-(methylbut-2-en-1-yl)-9H-purin-6-amin methansulfonátu)

45 Isopentenyladenin (203 mg; 1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (25 ml) a k roztoku byla přidána po kapkách kyselina methasulfonová (100 mg; 1,03 mmol). Roztok byl míchán 30 minut za laboratorní teploty a poté zahuštěn na rotační vakuové odparce na pevný bílý odparek, který byl vymíchán v acetonu (10 ml) za lab. teploty. Bílý krystalický produkt byl odfiltrován, promyt acetonem (3 x 5 ml) a vysušen do konstantní hmotnosti. Výtěžek: 257 mg (86 %). Čistota (HPLC-UV/VIS): 99 % +, ESI-MS: $[M + H]^+ = 204.12$

50

Příklad 9: Prášková difrakce (XRPD) krystalických solí BAP mesylátu, meta-topolin mesylátu, ortho-topolin mesylátu a kinetinu mesylátu a porovnání jejich difraktogramů s difraktogramy odpovídajících volnýchází BAP, meta-topolinu, ortho-topolinu a kinetinu.

55

Prášková rentgenová difrakce (XRPD) byla provedena na přístroji Bruker D8 Avance ECO diffractometer s použitím Cu K-alfa záření a SSD160 detektoru. Přibližně 5 mg vzorku bylo jemně natlačeno do XRPD držáku vzorku. Vzorek byl poté umístěn do přístroje v transmisním módu a analyzován při experimentálních podmínkách popsanych v tabelovaném přehledu viz níže:

5

XRPD podmínky měření

Scan axis gonio	
počáteční pozice [$^{\circ}2\theta$.]	4.0000
koncová pozice [$^{\circ}2\theta$.]	40.00
velikost scanu [$^{\circ}2\theta$.]	0.0100
Doba scanu [s]	0.3 (48) s
typ scanu	kontinuální
typ divergenční štěrbin	fixní
velikost divergenční štěrbin [$^{\circ}$]	0.3000
délka vzorku [mm]	10.00
teplota měření [$^{\circ}$ c.]	25.00
materiál anody	Cu
K-alpha1 [Å]	1.54060
K-alpha2 [Å]	1.54443
K-beta [Å]	1.39225
K-a2/k-a1 poměr	0.50000
nastavení generátoru	40 ma, 25 kv
poloměr goniometru [mm]	250.00
Dist. Focus-diverg. štěrbin [mm]	110.00
Spinning	ne

- 10 Srovnání difraktogramů krystalické soli BAP mesylátu a BAP volné báze překrytím obou difraktogramů je uvedeno na obr. 1, zatímco intenzita difraktovaného záření změřená detektorem pro krystalickou sůl BAP mesylátu je uvedena v tabulce 1. Intenzita difraktovaného záření (píků) pro BAP volnou bázi je uvedena v tabulce 2. Srovnání difraktogramů *meta*-topolin mesylátu a *meta*-topolinu je uvedeno na obrázku 2 formou překrytí difraktogramů. Intenzita difraktovaného záření zachycená detektorem pro *meta*-topolin mesylát je uveden v tabulce 3 zatímco pro *meta*-topolin volnou bázi v tabulce 4. Srovnání difraktogramů *ortho*-topolin mesylátu a *ortho*-topolinu formou překrytí je uvedeno na obr. 3. Intenzita difraktovaného záření zachyceného detektorem je pro *ortho*-topolin mesylát je uvedena v tabulce 5 zatímco pro *ortho*-topolin uvedena v tabulce 6. Intenzita difraktovaného záření pro krystalickou sůl kinetin mesylátu je uvedena v tabulce 7, zatímco pro kinetin volnou bázi v tabulce 8. Jak je viditelné z překryvů difraktogramů i intenzit difraktovaného záření krystalické soli cytokinin mesylátů se zásadním způsobem liší od difraktogramů volných bází cytokininů a všechny materiály, které byly k měření použity, byly materiály krystalické povahy.
- 25 Tab. 1: Relativní intenzity difraktovaného záření, úhly, d-spacing získané práškovou difrakcí pro krystalickou sůl BAP mesylátu

úhel (2-theta)	d-spacing (Å)	rel. intenzita
5,721	15,43427	6,9 %
6,155	14,34703	100,0 %
8,216	10,75322	1,0 %
8,453	10,45186	3,5 %
9,961	8,87309	17,5 %
11,405	7,75224	1,3 %
12,331	7,17224	1,6 %
12,68	6,97581	5,1 %

12,908	6,85299	2,0 %
14,62	6,05411	0,4 %
15,205	5,82247	11,9 %
15,698	5,64048	11,8 %
16,037	5,5221	2,3 %
16,472	5,37725	1,6 %
16,681	5,31033	0,9 %
16,872	5,25081	3,8 %
17,214	5,14723	0,8 %
17,683	5,01177	0,3 %
18,035	4,91453	0,2 %
18,557	4,7775	55,5 %
18,764	4,72538	17,3 %
19,319	4,59075	21,4 %
19,986	4,43908	8,1 %
20,139	4,4056	4,7 %
20,448	4,33983	11,3 %
20,868	4,25336	3,4 %
21,508	4,12834	5,7 %
22,022	4,03299	1,4 %
22,449	3,95727	1,3 %
22,85	3,8887	0,6 %
23,055	3,85465	0,2 %
23,5	3,78255	21,4 %
23,805	3,73478	20,5 %
24,427	3,6411	17,4 %
24,807	3,58623	2,1 %
24,973	3,56275	0,5 %
25,33	3,51335	0,9 %
25,519	3,48779	7,8 %
26,035	3,41984	7,3 %
26,174	3,40192	4,6 %
26,749	3,33008	1,3 %
27,077	3,29052	3,2 %
27,558	3,23414	25,5 %
28,193	3,16277	0,7 %
28,69	3,1091	1,2 %
28,949	3,08183	1,5 %
29,474	3,02815	1,0 %
29,782	2,99751	0,3 %
29,838	2,992	0,3 %
30,234	2,95367	0,8 %
30,69	2,91085	2,9 %
31,133	2,87043	0,9 %
31,55	2,83341	1,2 %
31,852	2,80728	0,4 %
32,137	2,78299	2,1 %
32,388	2,76198	3,4 %
33,356	2,68404	2,2 %
33,503	2,67258	1,1 %
34,184	2,62088	0,3 %
34,666	2,58558	0,8 %

35,559	2,52264	0,8 %
36,197	2,47962	1,1 %
36,583	2,45432	0,2 %
36,947	2,43102	0,9 %
37,494	2,39679	0,9 %
37,754	2,38088	0,9 %
38,059	2,36248	0,2 %
38,77	2,32077	0,6 %
39,185	2,29713	0,3 %
39,679	2,26968	0,9 %

Tab. 2: Změřené úhly, d-spacing a relativní intenzita v procentech získaná práškovou difrakcí pro BAP volnou bázi

Úhel (2-theta)	d spacing (Å)	rel. intenzita
5,831	15,14553	0,3 %
6,448	13,69776	100,0 %
10,915	8,09952	0,6 %
11,793	7,49808	0,2 %
12,925	6,8441	0,1 %
13,512	6,54808	0,5 %
15,623	5,66738	11,7 %
17,209	5,14865	0,0 %
18,198	4,87094	2,3 %
19,068	4,65074	2,2 %
19,429	4,56515	0,1 %
19,951	4,44672	0,3 %
20,532	4,32216	1,3 %
20,844	4,25832	0,9 %
21,952	4,04573	0,8 %
23,292	3,81593	2,7 %
23,789	3,73726	1,9 %
24,89	3,57441	0,5 %
25,067	3,54962	0,2 %
25,985	3,42626	2,5 %
26,73	3,33245	0,9 %
27,312	3,26272	3,6 %
27,878	3,19774	0,8 %
28,408	3,13926	0,4 %
30,068	2,96962	1,0 %
31,591	2,8299	0,0 %
32,359	2,76439	0,1 %
33,177	2,69810	0,5 %
33,867	2,64472	0,2 %
34,606	2,58989	0,0 %
34,978	2,56322	0,1 %
36,63	2,45128	0,0 %
36,856	2,43680	0,0 %
37,421	2,40128	0,1 %
37,819	2,37693	0,0 %
38,447	2,33951	0,0 %
38,777	2,32039	0,1 %

39,762	2,26515	0,0 %
--------	---------	-------

Tab. 3: Změřené úhly, d-spacing a relativní intenzity v procentech získaná práškovou difrací pro krystalickou sůl *meta*-topolin mesylátu (*m*-topolin mes)

Úhel (2-theta)	d spacing (Å)	rel. intenzita
4,708	18,75442	4,1 %
8,107	10,89665	67,3 %
8,872	9,95929	2,9 %
9,295	9,5067	2,0 %
9,683	9,12666	78,1 %
10,077	8,77112	0,7 %
13,118	6,74372	46,6 %
14,081	6,28446	1,1 %
14,26	6,20607	2,0 %
14,589	6,06695	15,9 %
15,55	5,6941	63,7 %
16,821	5,26641	100,0 %
17,614	5,03108	98,6 %
17,896	4,9525	18,9 %
18,234	4,86135	4,3 %
19,066	4,6511	43,0 %
19,17	4,62614	36,0 %
19,405	4,57075	20,8 %
19,466	4,55634	31,6 %
19,508	4,54665	67,9 %
19,554	4,53623	33,9 %
19,685	4,50619	6,9 %
20,343	4,36194	2,4 %
21,195	4,1885	26,7 %
22,198	4,00154	58,1 %
22,97	3,86865	39,2 %
23,64	3,76049	21,9 %
24,576	3,61945	51,3 %
24,785	3,58936	57,8 %
24,862	3,57834	72,9 %
25,198	3,53144	9,8 %
25,673	3,46723	69,1 %
26,227	3,39523	12,7 %
26,754	3,32944	6,5 %
27,512	3,23941	7,0 %
27,455	3,24599	8,3 %
27,833	3,20287	6,1 %
28,679	3,1102	6,7 %
29,083	3,06798	10,5 %
29,423	3,03326	19,7 %
29,57	3,01855	14,6 %
29,799	2,9958	9,4 %
30,172	2,95961	3,7 %
30,861	2,89509	6,1 %
31,554	2,83313	7,7 %
32,193	2,77827	1,9 %

32,495	2,75319	1,0 %
33,01	2,7114	3,1 %
33,24	2,69315	9,1 %
34,109	2,62647	1,7 %
34,52	2,59613	0,7 %
35,075	2,55631	4,9 %
35,718	2,51178	1,3 %
36,412	2,46549	1,4 %
36,776	2,44189	2,4 %
37,815	2,37715	1,0 %
38,246	2,35137	1,8 %
38,611	2,32997	0,5 %
39,182	2,29732	5,0 %
39,606	2,27371	9,3 %
39,728	2,267	4,8 %

Tab. 4: Změřené úhly, d-spacing, relativní intenzita v procentech získaná práškovou difrakcí pro *meta*-topolin volnou bázi

Úhel (2-theta)	d spacing (Å)	rel. intenzita
7,074	12,48654	100,00%
10,535	8,39088	7,00%
12,208	7,24412	67,80%
14,224	6,22163	24,20%
14,583	6,06943	32,50%
17,44	5,08094	19,30%
17,656	5,01919	29,80%
18,011	4,92124	38,00%
18,513	4,78881	4,50%
19,534	4,54079	2,50%
20,278	4,37586	13,70%
21,16	4,19532	77,10%
22,552	3,93939	12,90%
23,403	3,79813	30,30%
23,729	3,74668	49,90%
24,726	3,59781	30,70%
25,839	3,44522	19,00%
26,523	3,35799	48,20%
26,944	3,3064	2,50%
27,56	3,23397	4,50%
27,913	3,19379	3,20%
28,666	3,11159	16,90%
29,751	3,00056	6,70%
30,444	2,93381	6,50%
31,066	2,87647	4,10%
31,706	2,81986	10,60%
32,102	2,78599	0,70%
33,171	2,69862	5,50%
33,784	2,65098	2,60%
34,586	2,59131	0,30%
34,935	2,56625	0,80%
35,963	2,49523	1,70%

36,907	2,43353	1,30%
37,415	2,40164	1,90%
38,336	2,34605	0,50%
38,773	2,32058	0,80%
39,396	2,28533	1,30%
39,654	2,27104	4,20%

Tab. 5: Změřené úhly, d-spacing a relativní intenzita v procentech získaná práškovou diffrakcí pro krystalickou sůl *ortho*-topolin mesylátu

Úhel (2-theta)	d-spacing (Å)	rel. intenzita
8,207	10,76503	1,5 %
8,365	10,56215	4,4 %
9,644	9,16369	7,4 %
9,822	8,99838	27,1 %
12,147	7,28043	81,2 %
14,156	6,25123	17,3 %
14,648	6,04243	14,3 %
15,391	5,75247	1,7 %
16,582	5,34174	8,1 %
16,629	5,32689	9,9 %
16,759	5,28574	22,8 %
16,961	5,22346	2,7 %
17,8	4,97896	20,7 %
17,834	4,96969	13,5 %
18,155	4,88242	16,1 %
18,287	4,84747	45,7 %
18,311	4,84129	44,5 %
18,566	4,77537	14,5 %
19,707	4,50128	13,2 %
20,296	4,37198	14,9 %
20,656	4,29662	26,5 %
20,797	4,26783	12,4 %
21,745	4,08382	18,2 %
22,724	3,90994	4,3 %
22,832	3,89183	5,9 %
23,271	3,81932	100,0 %
23,584	3,76928	1,9 %
24,136	3,68442	21,5 %
24,45	3,63775	14,9 %
24,497	3,63088	15,6 %
24,992	3,56012	11,8 %
25,149	3,53816	50,5 %
25,535	3,48558	3,8 %
25,897	3,43771	1,2 %
26,166	3,40301	2,7 %
26,793	3,32473	21,4 %
26,863	3,3162	12,6 %
27,16	3,28067	12,7 %
27,544	3,23576	12,2 %
28,019	3,18198	6,5 %
28,483	3,1312	6,2 %

28,558	3,12315	5,5 %
29,5	3,02553	18,3 %
29,98	2,97813	2,2 %
30,364	2,94131	8,5 %
30,451	2,9332	5,8 %
31,057	2,87724	1,9 %
31,189	2,86543	2,1 %
31,772	2,81412	4,8 %
31,852	2,80724	2,5 %
32,132	2,78343	1,6 %
32,714	2,73524	0,3 %
32,738	2,7333	0,6 %
33,533	2,67029	4,3 %
33,717	2,6561	3,6 %
33,921	2,64059	3,9 %
33,969	2,63703	3,7 %
34,322	2,61069	1,2 %
34,567	2,5927	2,8 %
34,616	2,58918	2,8 %
34,912	2,56788	3,4 %
34,884	2,56987	3,3 %
35,213	2,54666	1,0 %
35,852	2,50272	2,0 %
36,231	2,47738	2,3 %
36,614	2,45234	2,9 %
36,723	2,4453	2,6 %
37,02	2,42637	3,5 %
37,351	2,40559	1,3 %
38,549	2,33356	2,1 %
38,481	2,33752	5,0 %
38,532	2,33455	3,3 %
39,233	2,29444	4,1 %

Tab. 6: Změřené úhly, d-spacing a relativní intenzita v procentech získaná práškovou difrakcí pro *ortho*-topolin volnou bázi

Úhel (2-theta)	d-spacing (Å)	rel. intenzita
6,36	13,88626	100,0 %
12,609	7,01461	1,5 %
15,507	5,70981	12,2 %
15,559	5,6907	12,1 %
15,655	5,65596	13,9 %
16,71	5,30113	59,4 %
17,436	5,0821	45,2 %
18,947	4,6801	31,6 %
19,014	4,66371	35,6 %
19,1	4,643	43,8 %
19,97	4,44267	4,9 %
20,587	4,31072	11,0 %
23,786	3,73771	26,2 %
25,028	3,5551	18,8 %
25,225	3,52769	12,2 %

25,301	3,51731	12,8 %
25,889	3,4387	4,0 %
26,566	3,35267	37,7 %
27,318	3,26203	41,6 %
28,028	3,18093	1,2 %
28,188	3,16328	1,6 %
29,166	3,05934	14,9 %
29,491	3,02645	11,9 %
31,195	2,86489	3,4 %
31,596	2,82945	2,3 %
32,75	2,73234	6,4 %
32,792	2,72894	6,6 %
33,425	2,67866	3,1 %
33,651	2,66118	2,9 %
34,95	2,56521	4,4 %
35,816	2,50514	2,3 %

Tab. 7: Změřené úhly, d-spacing relativní intenzita v procentech získaná práškovou difrakcí pro krystalickou sůl kinetin mesylátu

Úhel (2-theta)	d-spacing (Å)	rel. intenzita
6,238	14,15724	100,0 %
6,971	12,67021	1,2 %
9,416	9,38466	1,1 %
10,148	8,70928	6,9 %
10,292	8,5877	3,5 %
10,603	8,33663	4,4 %
11,24	7,86575	2,1 %
11,475	7,70524	1,1 %
12,17	7,2667	2,5 %
12,377	7,14537	4,7 %
12,562	7,04094	4,6 %
13,128	6,73835	9,6 %
14,323	6,17907	3,1 %
15,051	5,88178	4,5 %
15,176	5,83327	1,1 %
15,799	5,60469	3,3 %
16,203	5,46585	6,8 %
17,095	5,18275	2,1 %
17,327	5,11395	2,2 %
17,515	5,05948	2,0 %
18,665	4,75008	14,0 %
18,882	4,69604	38,7 %
19,835	4,47249	26,0 %
20,119	4,4101	23,2 %
20,389	4,35212	46,9 %
20,668	4,29413	10,2 %
20,839	4,25928	14,0 %
21,397	4,14938	6,6 %
21,976	4,04131	3,3 %
22,634	3,92529	27,4 %
22,76	3,90391	17,3 %

22,981	3,86685	22,7 %
23,923	3,71668	33,8 %
24,132	3,68494	13,2 %
24,844	3,58099	3,8 %
24,978	3,5621	5,8 %
25,218	3,52875	3,4 %
26,172	3,40223	1,5 %
26,445	3,36765	4,7 %
26,65	3,34226	9,3 %
26,861	3,31649	4,6 %
27,417	3,25044	1,9 %
27,672	3,22113	39,9 %
27,755	3,21163	72,5 %
28,062	3,17716	9,0 %
28,536	3,12548	2,0 %
29,344	3,04125	0,5 %
30,394	2,93849	1,1 %
31,452	2,84201	0,9 %
32,349	2,76522	3,0 %
32,49	2,75361	4,5 %
32,868	2,72281	4,2 %
34,527	2,59567	0,8 %
34,779	2,5774	1,4 %
35,09	2,55526	1,4 %
35,526	2,5249	0,7 %
36,152	2,48262	0,7 %
37,197	2,41524	0,9 %
37,472	2,39811	1,2 %
37,808	2,37761	1,7 %
38,303	2,34798	0,9 %
39,807	2,26269	0,5 %

Tab. 8: Změřené úhly, d-spacing a relativní intenzita v procentech získaná práškovou difrakcí pro kinetin volnou bázi

Úhel (2-theta)	d-spacing (Å)	rel. intenzita
6,418	13,76056	0,2 %
7,098	12,44319	100,0 %
11,394	7,75957	0,5 %
12,7	6,96462	0,3 %
14,157	6,25098	0,4 %
15,491	5,71548	0,0 %
17,176	5,15854	10,2 %
19,236	4,61044	5,7 %
19,726	4,49692	0,3 %
20,872	4,25261	3,6 %
21,345	4,15939	0,6 %
23,024	3,85973	4,4 %
23,553	3,77427	3,1 %
24,12	3,68676	1,6 %
24,812	3,58546	1,2 %
25,478	3,49323	1,5 %

26,028	3,42071	0,7 %
26,976	3,30263	6,8 %
27,391	3,2535	0,4 %
28,441	3,13568	7,8 %
28,699	3,10812	1,3 %
29,636	3,01194	0,7 %
30,132	2,96351	0,1 %
31,561	2,83251	0,4 %
32,169	2,7803	0,1 %
33,332	2,6859	0,2 %
34,734	2,58068	0,7 %
35,37	2,53568	0,2 %
36,032	2,49063	0,3 %
36,686	2,44772	0,1 %
38,07	2,3618	0,1 %
38,712	2,32411	0,3 %

Příklad 10: Charakterizace krystalických solí BAP mesylátu, *meta*-topolin mesylátu, *ortho*-topolin mesylátu and kinetin mesylátu metodou ^1H -nukleární magnetické rezonance (NMR)

- 5 ^1H Nukleární magnetická rezonance (^1H NMR) byla provedena na přístroji JEOL 500 SS pracujícím při teplotě 300 K a frekvenci 500,13 MHz. Vzorčky byly připraveny rozpuštěním látek v DMSO- d_6 . Tetramethylsilan (TMS) byl použit jako interní standard. Kalibrace chemických posunů byla vztažena k reziduálnímu piku rozpouštědla ^1H DMSO- d_6 , 2.50 ppm. Každý vzorek byl připraven v ca. 5 mg koncentraci. Chemické posuny indentifikované ve spektru krystalickým
10 solím cytokininových mesylátů odpovídají popsané chemické sloučenině a jsou následující:

***meta*-topolin mesylát** (6-(3-hydroxybenzylamino)purin mesylát): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ 9.55 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.28 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.00 – 6.94 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 2.35 (s, 3H).

15

BAP mesylát: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ 9.66 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.40 – 7.29 (m, 5H), 7.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.80 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.35 (s, 3H).

kinetin mesylát: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ 9.53 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.45 (s, 2H), 4.85 (s, 2H), 2.40 – 2.34 (m, 3H).

20

***ortho*-topolin mesylát** (6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ 9.27 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.18 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.14 – 7.07 (m, 1H), 6.83 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.74 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 2.29 (s, 3H).

25

(Z)-zeatin (*cis*-zeatin): ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.67 (s, 3H); 3.81 (d, 2H, $J = 5.2$); 4.15 (m, 2H); 4.72 (t, 1H, $J = 5.55$); 5.55 (t, 1H, $J = 6.8$); 7.67 (bs, 1H); 8.07 (s, 1H); 8.19 (s, 1H)

(E)-zeatin (*trans*-zeatin): ^1H NMR (DMSO- d_6): 1.69 (s, 3H); 3.80 (d, 2H, $J = 7.0$); 4.15 (bs, 2H); 4.75 (t, 1H); 5.53 (t, 1H, $J = 7.0$); 8.09 (s, 1H); 8.19 (s, 1H)

30

Dihydrozeatin (racemát): ^1H NMR (DMSO- d_6): 1.00 (d, 3H, $J = 6.8$); 1.51 (m, 1H); 1.75 (m, 1H); 1.85 (m, 1H); 3.44 (dd, 1H, $J = 11.0$, $J = 6.0$); 3.48 (dd, 1H, $J = 11.0$); 3.66 (m, 2H); 8.06 (s, 1H), 8.22 (s, 1H)

35

Isopentenyladenin: ^1H NMR (DMSO- d_6): 1.67 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 4.08 (br s, 1H), 5.31 (s, 1H), 7.55 (bs, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.16 (s, 1H)

Při porovnání naměřených chemických posunů ^1H NMR spekter výše uvedených cytokininových mesylátů s jejich odpovídajícími volnými bázemi (BAP, *meta*-topolin, *ortho*-topolin a kinetin), což jsou známé, v literatuře popsane látky, jsou patrné signifikantní rozdíly, zejména u těch hodnot chemických posunů, které jsou v blízkosti protonizovaných vodíků.

Příklad 12: Monokrystalová rentgenostrukturní analýza a popis určené molekulové struktury krystalické soli *meta*-topolin mesylátu

Příprava monokrystalu: Krystaly byly získány z *meta*-topolin mesylátu (ca 100 mg), který byl rozpuštěn v methanolu (40 cm³). Roztok byl pak ponechán k volnému vypařování rozpouštědla skrze parafilm, kterým byla přetažena kádinka, cca 14 dnů při RT.

Monokrystalová RTG difrakce: Vhodné krystaly byly vybrány ze vzorku připraveného viz výše. Difrakční data byla sbírána za pomoci čtyřkruhového difraktometru Supernova s Cu/K α zářením kolimovaným pomocí tenkovrstvých zrcadel, s použitím uzavřené mikro-fokusované rtg trubice, který je vybaven CCD detektorem Atlas S2, pracujícím při teplotě 94.94 (13) K. Při analýze krystalové struktury bylo zjištěno, že struktura 6-(3-hydroxypurinia mesylátu (*meta*-topolin mesylátu) se jeví jako centrosymetrický dimer spojený níže diskutovanými vodíkovými vazbami. Krystalová soustava byla určena jako kosočtverečná (orthorombická) s prostorovou skupinou Pna21 a s následujícími parametry základní buňky: $a=14,9313$ (1), $b=7,8302$ (3), $c=25,1594$ (1) Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$, objemem základní buňky $V=2941.51$ Å³. Sběr dat, redukce a absorpční korekce byly uskutečněny s použitím CrysAlisPro software (Rigaku Oxford Diffraction, 2018) CrysAlis version 1.171.40.53). Asymetrická jednotka zkoumané sloučeniny je tvořena kationtem 6-(3-hydroxybenzylamino)purinium a mesylátovým aniontem. Vodíkové atomy připojené na uhlíky byly umístěny do struktury ve vypočtených pozicích. Některé vodíky připojené na kyslík byly lokalizovány v diferenční mapě. Intermolekulární vodíkové interakce mezi vodíky N-H purinového kationtu a kyslíkovým atomem mesylátového aniontu spojují dvě molekuly sloučeniny do centrosymetrického dimeru. Tyto vodíkové vazby stabilizují systém a spojují N6a..H6b purinového kationtu s O1a mesylátového aniontu, N7a..H7a purinu s O5b mesylátového aniontu, O4b..H4b hydroxylu připojeného na benzenový kruh *meta*-topolinového kationtu s O5b mesylátového aniontu a vice versa O4a...H4a *meta*-topolinového kationtu s O1b mesylátového aniontu (obr. 4). Výsledný "konvenční" R-faktor (založený na F a 5945 reflexích s $[F^2 > 2\sigma(F^2)]$) byl 0.0257.

Monokrystalová struktura krystalické soli *meta*-topolinu mesylátu ukazuje, že sloučenina má obecný sumární vzorec C₁₃H₁₅N₅O₄S a je složena z 6-(3-hydroxybenzylamino)purinium kationtu a mesylátového aniontu, viz obrázek 4. Centrosymetrické dimery jsou spolu spojeny množstvím intermolekulárních vodíkových interakcí, které jsou zejména realizovány mezi vodíky napojenými na dusíky protonizovaného kationtu a kyslíky mesylátového aniontu a dále mezi vodíkem hydroxylové skupiny napojené na benzenový kruh a kyslíkem mesylátového aniontu, což pravděpodobně přispívá k výborné rozpustnosti dané sloučeniny ve vodě. Důležité torzní úhly, které mají také dopad na fyzikální vlastnosti a rozpustnost zkoumaných látek jsou silně ovlivněny právě vytvořením husté sítě mezimolekulárních vodíkových vazeb.

Příklad 13: Monokrystalová rtg difrakce /analýza/ krystalické soli *ortho*-topolinu mesylátu

Příprava monokrystalu:

Krystaly byly připraveny rozpuštěním 100 mg *ortho*-topolinu mesylátu v metanolu (30 cm³). Roztok byl ponechán v kádince přikryté parafilmem k volnému odpařování rozpouštědla. Čiré krystaly se vytvořily po sedmi dnech od vytvoření roztoku.

Monokrystalová rtg difrakce: Z krystalizovaného vzorku byly vybrány vhodné krystaly pro sběr dat. Difrakční data byla naměřena s použitím čtyřkruhového difraktometru Xcalibur Gemini ultra s Cu/K α zářením ($\lambda = 1,54184$ Å) s grafitovým monochromátorem vybaveným CCD detektorem

- Atlas S2 pracujícím při 120.01(10) K. Krystalografická soustava byla identifikována jako monoklinická s prostorovou grupou $P2_1/c$ s následujícími parametry základní buňky: $a=10,3822$ (4), $b=21,0265$ (5), $c=8,1025$ (2) Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=107.466^\circ$, $\gamma=90^\circ$, objemem základní buňky $V=1688,21$ (9) Å³. Strukturní model byl nalezen za použití software Superflip nebo SHELXT a vypřesněn metodou nejmenších čtverců softwarem JANA2006. Sběr dat, redukční a absorpční korekce pro danou sloučeninu byly provedeny za pomoci software CrysAlisPro Software (Rigaku, Oxford Diffraction, 2018, CrysAlis version 1.171.40.35a). Rentgenostrukturní analýzou bylo určeno, že asymetrická jednotka zkoumané sloučeniny sestává z 6-(2-hydroxybenzylamino)purinium kationtu a mesylátového aniontu, ale také z jedné molekuly rozpouštědla, tzn. metanolu. Vodíkové atomy připojené na uhlík byly umístěny ve vypočítaných pozicích. Některé vodíkové atomy připojené na kyslíky byly lokalizovány v diferenční mapě. Mezimolekulární vodíkové vazby jsou lokalizovány mezi N-H atomy puriniového kationtu a kyslíkovými atomy mesylátového aniontu a puriniový kationt je také vodíkovou vazbou propojen s molekulou rozpouštědla metanolu. Vodíkové vazby stabilizují celý systém a spojují N6..H6 vodíkový atom purinové struktury s O2 atomem mesylátového aniontu, dále N7..H7 purinové struktury s O2 atomem mesylátového aniontu. Dále, O5...H5 vodíkový atom methanolu je vodíkovým můstkem spojen s O2 mesylátového aniontu a současně k N7...H7 purinového skeletu ortho-topolinového kationtu.
- Struktura molekuly je zachycena na obrázku 5. O1..H1 vodíkový atom hydroxylové skupiny připojené na benzenový kruh je vodíkovou vazbou spojený s O3 atomem mesylátového aniontu. Výsledný "konvenční" R-faktor [založený na F a 3024 reflexích s $[F^2 > 2\sigma(F^2)]$] byl 0.0324. Monokrystalová struktura krystalické soli *ortho*-topolin mesylátu obecného sumárního vzorce $C_{14}H_{19}N_5O_5S$ sestává z 2-hydroxybenzylaminopurinium kationtu a mesylátového aniontu doprovázeného molekulou solvatovaného methanolu. Centrosymetrické dimery asymetrické základní jednotky jsou spolu propojeny sítí výše uvedených intermolekulárních vodíkových vazeb, které jsou realizovány zejména mezi protonizovanými kationty a mesylátovými anionty, ale zahrnují také solvatovaný metanol. Tyto vodíkové vazby silně ovlivňují torzní úhly v molekule, které mají dopad na fyzikálně chemické vlastnosti molekul a tím, spolu se samotnou tvorbou vodíkových vazeb, přispívají k výrazně lepší rozpustnosti připravené molekuly ve vodě a polárních rozpouštědlech.

Příklad 14: Rozpustnost krystalické soli *meta*-topolin mesylátu ve vodě

- Rozpustnost ve vodě byla stanovena následujícím protokolem. Byl připraven supernasycený roztok krystalické soli *meta*-topolin mesylátu. Roztok byl přefiltrován od viditelných nerozpouštěných částic soli a byl obdržen homogenní nasycený roztok. Nasycený roztok byl zředěn 1:10 000 a měřen s použitím HPLC Alliance Waters 2690 s C18 kolonou s průměrem 2.1 mm, délkou 150 mm a porozitou 5 µm. Vzorek byl rozpuštěn v mobilní fázi (MeOH: HCOONH₄ - 1: 9). Vzorek byl proplachován metanolem s gradientem (10-90%, 35 min) při pH 4 a průtokové rychlosti 0.3 ml/min. Absorbance byla měřena v UV oblasti záření při 210 až 400 nm. Plocha píku krystalické soli *meta*-topolin mesylátu byla 595 027. Získaná plocha píku byla porovnána s plochami píku při určitých koncentracích naměřených viz. tabulka 9 při určitých konkrétních koncentracích látky ve vodě a tak byla určena finální koncentrace nasyceného roztoku *meta*-topolin mesylátu ve vodě.

Tab. 9: Měřené plochy píku pro konkrétní koncentrace *meta*-topolin mesylátu ve vodě.

c (µM)	Plocha píku <i>meta</i> -topolin mesylátu
10	261426
25	637311
50	1253289

To tedy znamená, že nasycená koncentrace *meta*-topolin mesylátu byla přibližně stanovena na 24010,81 μM , což znamená 24,011 mM (8 mg/ml), což je řádově lepší rozpustnost ve vodě, než je popsána u *meta*-topolinu volné báze. U *meta*-topolinu volné báze se uvádí rozpustnost menší než 0.25 mg/ml; my jsme měřením zjistili koncentraci nasyceného roztoku pouze 0.06 mg/ml.

5 Rozpustnost dalších mesylátů byla také stanovena tímto způsobem a koncentrace nasycených roztoků jsou uvedeny níže:

Volná CK báze	c původní látky [mM]	Mesylát cytokininu	c mesylátu cytokininu [mM]
6-(2-hydroxybenzylamino)purin (o-topolin)	0,03	6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát	82,3
6-(3-hydroxybenzylamino)purin (m-topolin)	0,06	6-(3-hydroxybenzylamino)purinmesylát	24,011
6-(benzylamino)purin (BAP)	0,37	6-(benzylamino)purin mesylát	354,13
6-(3-methoxybenzylaminp)purin	0,21	6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát mesylát	47,54
Kinetin	0,14	kinetin mesylát	92,56

Příklad 15: Rozpustnost krystalické soli *meta*-topolin mesylátu ve srovnání s *meta*-topolinem v různých organických rozpouštědlech

Rozpustnost v různých organických rozpouštědlech byla měřena za použití následujícího protokolu. Přibližně 25 mg vzorku krystalické soli *meta*-topolinu mesylátu a *meta*-topolinu byly umístěny do 48 vialek. Pět objemových alikvot každého rozpouštědla bylo postupně přidáno do jednotlivých vialek. Před každým následujícím přidáním byla směs ověřena na rozpustnost, a pokud nebyl vzorek rozpuštěn, bylo pokračováno s přidávkem dalšího alikvotu rozpouštědla.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 10. Zatímco rozpouštění v polárních rozpouštědlech (voda, alkoholy) se výrazně liší, téměř žádné rozdíly mezi mesylátovou solí a volnouází nebyly zaznamenány v organických nepolárních rozpouštědlech.

Tab.10: Rozpustnost *meta*-topolinu mesylátu ve srovnání s *meta*-topolinem volnouází v různých organických rozpouštědlech

Rozpouštědlo	<i>meta</i> -topolin mes	<i>meta</i> -topolin
methanol	0,7 mg/ml	5 mg/ml
ethanol	0,4 mg/ml	5 mg/ml
DMF	6 mg/ml	6 mg/ml
DMSO	22 mg/ml	24 mg/ml
aceton	0,4 mg/ml	0,4 mg/ml
heptan	<0,1 mg/ml	<0,1 mg/ml
acetonitril	<0,25 mg/ml	<0,25 mg/ml

Příklad 16: Stabilita krystalické soli *meta*-topolin mesylátu při skladování po dobu 30 dní v pevném stavu a ověření stability XRPD

50 mg vzorku krystalické soli *meta*-topolin mesylátu bylo umístěno do ependorfské a uzavřeno. Stabilita vzorku byla testována uskladněním pevné látky 25° C po 30 dnech od uložení vzorku. Nebyly pozorovány žádné opticky hodnotitelné změny jako například změna barvy nebo struktury materiálu a žádná změna nebyla pozorována ani u XRPD záznamu látky pořízeného po 30 dnech od uskladnění. Obr. 6 ukazuje práškový difraktogram *meta*-topolin mesylátu po 60 dnech srovnaného s difraktogramem vzorku soli pořízeného po přípravě látky.

Příklad 17: Disproporcionační studie krystalické soli *meta*-topolin mesylátu

50 mg vzorku krystalické soli *meta*-topolin mesylátu bylo rozpuštěn v 250 mikrol destilované vody, ponechán 48 v roztoku a pak vykrystalován a byl změřen XRPD difraktogram, aby byly zjištěny případné disproporcionační změny. Z difraktogramu nebyla žádná disproporcionace pozorována, látka svou strukturu nezměnila.

Příklad 18: *In vitro* cytotoxická aktivita nových krystalických solí cytokinin mesylátů (metabolizace calceinu)

Protože toxické sloučeniny negativně ovlivňují metabolické procesy buněk, je mnoho standardních testů cytotoxicity založeno na měření rychlosti metabolizace různých umělých substrátů. Výsledný produkt je pak kvantifikován například pomocí spektrometrie. Testy lze snadno modifikovat pro použití v 96-jamkových destičkách. Pro vyhodnocení cytotoxicity cytokininů, například *meta*-topolinu, *ortho*-topolinu, kinetinu, BAP anebo jejich mesylátových solí, ale i řady dalších derivátů cytokininových mesylátů podle vynálezu byl použit mikrotitrační test založený na kvantifikaci metabolizace Calceinu AM. Test je široce používán v programech screeningu léků a při testování chemosenzitivity. V živých buňkách je Calcein AM enzymaticky hydrolyzován a kumulace výsledného kalceinu se projevuje zelenou fluorescencí.

Následující buněčné linie - RPMI 8226 (mnohočetný myelom), CEM (T-lymfoblastická leukémie), K562 (chronická myeloidní leukémie), HL-60 (promyelocytární leukémie), MCF-7 (adenokarcinom prsu), HeLa (karcinom děložního čípku), G361 (maligní melanom), HOS (lidský osteosarkom) a BJ (lidské předkožkové fibroblasty) - byly získány ze sbírky American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Tyto buňky byly udržovány ve standardním médiu DMEM nebo RPMI (Sigma, MO, USA) doplněném tepelně inaktivovaným fetálním hovězím sérem (10%) 2 mM L-glutaminem a penicilin-streptomycinem (1%) za standardních podmínek buněčné kultury (37°C, 5% CO₂ ve vlhkém prostředí) a subkultivovány dvakrát nebo třikrát týdně pomocí standardního trypsinizačního postupu.

Přibližně 10 000 buněk v 80 µl média bylo naočkováno do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Po 12 hodinách inkubace byly sloučeniny, které se měly testovat, přidány ve 20 µl podílech. Kontrolní kultury byly ošetřeny samotným DMSO. Konečná koncentrace DMSO v médiu nepřesáhla 0,5%. Byla testována sériová, trojnásobná ředění (celkem šest, nejvyšší koncentrace v inkubacích 166 µM) každé sloučeniny. Po 72 hodinách inkubace byl přidán roztok Calcein AM (Molecular Probes) do konečné koncentrace 1 µg/ml a buňky byly inkubovány další hodinu. Fluorescence volného kalceinu byla poté kvantifikována s použitím fluorometru Fluoroscanner Ascent (Microsystems) a procento přeživajících buněk v každé jamce bylo vypočteno dělením OD získané z každé buňky exponovanými buňkami střední OD získanou z kontrolních jamek × 100%. Nakonec byly vypočteny hodnoty IC₅₀ (koncentrace způsobující 50% pokles aktivity buněčné esterázy) pro každou sloučeninu generovaných z křivek závislosti odpovědi na dávce (Kryštof et al., 2005, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12, 3283-3286). Zde uvedené hodnoty IC₅₀ jsou průměry získané z alespoň tří nezávislých experimentů, kde jednotlivé hodnoty replikace spadaly do 20% průměru. Inhibice růstu byla vypočtena pomocí následující rovnice: $IC_{50} = \frac{(\text{průměr } FD_{\text{jamka exponovaná k léčivu}} - \text{průměr } FD_{\text{blank}})}{(\text{průměr } FD_{\text{kontrolní jamky}} - \text{průměr } FD_{\text{blank}})} \times 100\%$. Hodnota IC₅₀, koncentrace léčiva způsobující 50% snížení konverze Calceinu AM, byla vypočtena z získaných křivek závislosti odpovědi na dávce.

Cytotoxicita sloučenin byla testována na panelu buněčných linií různého histogenetického a druhového původu. Jak je uvedeno v Tab. 11, IC₅₀ cytokinin mesylátů překročila obvykle maximální testovanou koncentraci, což naznačuje, že sloučeniny by mohly být aplikovány v koncentracích vyvolávajících požadovaný účinek bez negativních vedlejších účinků. Pro srovnání, mnoho mesylátových solí přirozeně se vyskytujících cytokininů nevykazovaly ani nízkou cytotoxicitu.

Tab. 11. Cytotoxická aktivita cytokininových mesylátů vyjádřená v hodnotách IC₅₀ po 3-denním Calcein-AM testu. Prezentované hodnoty jsou průměry alespoň 3 nezávislých experimentů, kde jednotlivé replikáty spadají do 20% interval spolehlivosti.

Sloučenina	testovaná buněčná linie/IC ₅₀ (μmol/L)							
	HOS	K-562	MCF7	B16-F0	NIH-3T3	G-361	CEM	HL60
Kinetin	>166,7	>166,7	>166,7				155,1	
Kinetin mesylát		>166,7	>166,7				>166,7	
isopentenyladenin	>166,7	146,9	>166,7				92,2	>166,7
isopentenyladenin mesylát		162,2	>166,7				127,9	
6-benzylaminopurin	>166,7	138,9	166,1				>166,7	>166,7
6-benzylaminopurin mesylát		>166,7	>166,7		>166,7		>166,7	
cis-zeatin (cZ)	>166,7	>166,7	>166,7				>166,7	>166,7
cis-zeatin mesylát		>166,7	>166,7				>166,7	
dihydrozeatin (DHZ)	>166,7	>166,7	>166,7				>166,7	>166,7
dihydrozeatin mesylát		>166,7	>166,7				>166,7	
meta-topolin (mT)	>166,7	128,4	>166,7	90,6		>166,7	90,1	79,2
meta-topolinmesylát		141,7	>166,7				>166,7	
ortho-topolin (oT)	>166,7	>166,7	>166,7	150		103,4	69,2	78,0
ortho-topolin mesylát		>166,7	>166,7				89,4	
6-(2-fluorobenzylamino)purin	>166,7	136,1	>166,7	27,7		106,4	98	
6-(2-fluorobenzylamino)purin mesylát	>166,7	70,7	>166,7				99,5	126,5
6-(2-chlorobenzylamino)purin	84,9	101,0	164,1	16,9	>166,7	56,6	58,4	109,6
6-(2-chlorobenzylamino)purin mesylát	100,4	90,4	128,4				112,5	
6-(3-chlorobenzylamino)purin	>166,7	>166,7	>166,7			148,6	>166,7	>166,7
6-(3-chlorobenzylamino)purin mesylát		>166,7					>166,7	
6-(3-fluorobenzylamino)purin	>166,7	105,2	163,2			>166,7	>166,7	>166,7
6-(3-fluorobenzylamino)purin mesylát		135,7	>166,7				>166,7	
6-(4-fluorobenzylamino)purinBAP	>166,7	>166,7	>166,7			>166,7	66,4	59,2
6-(4-fluorobenzylamino)purinmesylát		>166,7	>166,7					
6-(3-methoxybenzylamino)purin	>166,7	>166,7	>166,7	41,5	>166,7	124,7	>166,7	>166,7
6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát		>166,7	>166,7				>166,7	
6-(4-methoxybenzylamino)purin	>166,7	>166,7	>166,7	84,7	>166,7	166,7	>166,7	>166,7
6-(4-methoxybenzylamino)purin mesylát	>166,7	118,0	>166,7				>166,7	

6-(2-methylbenzylamino)purin	>166,7	156,6	>166,7			>166,7	>166,7	>166,7
6-(2-methylbenzylamino)purin mesylát		>166,7	>166,7				>166,7	
6-(4-chlorobenzylamino)purin	>166,7	>166,7	>166,7				>166,7	>166,7
6-(4-chlorobenzylamino)purin mesylát		>166,7	>166,7				>166,7	
6-(2-methoxybenzylamino)purin	>166,7	115,8	153,0				63,4	>166,7
6-(2-methoxybenzylamino)purin mesylát		116,7	>166,7				98,2	
6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin		>166,7	26,6	69,0			41,6	64,3
6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purin mesylát		>166,7	32,1				51,0	67,8
<i>trans</i> -zeatin (tZ)		>166,7	>166,7				>166,7	>166,7
<i>trans</i> -zeatin mesylát		>166,7	>166,7				>166,7	>166,7

Příklad 19: *In vitro* cytotoxicita nových derivátů v nekarcinogenních buňkách - kožní fibroblasty (BJ) a keratinocyty (HaCaT, ARPE-19) - stanovená za pomoci resazurinové redukční esej

5

Resazurin (7-Hydroxy-3*H*-phenoxazin-3-one 10-oxide) je modrá slabě fluorescentní látka, která je mitochondriemi ireverzibilně redukována na červený vysoce fluorescentní resofurin. Používá se proto k hodnocení viability bakteriálních i eukaryotických buněk. V testu byl sledován vliv 72 hodinového působení několika koncentrací látek (trojnásobná ředící řada, maximální koncentrace = 100 mikroM) na viabilitu kožních fibroblastů BJ, keratinocytů HaCaT a buněk sítnice ARPE-19.

10

Buňky byly pěstovány ve standardních kultivačních podmínkách (5.5 % CO₂, 37° C, 100 % vdušná vlhkost) v médiu DMEM s 10 % fetálním bovinním sérem. Subkultivace byla prováděna dvakrát týdně. Na test toxicity bylo 5000 buněk vyseto do jednotlivých jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky. Pět krát koncentrované testované látky byly přidány po 24 hodinách. Po 72-hodinovém působení byl přidán 11x koncentrovaný roztok resazurinu do finální koncentrace 0.0125 mg/ml.

15

Fluorescence byla měřena po 1-hodinové (ARPE-19) případně 3-hodinové (HaCaT a BJ) inkubaci. Hodnoty IC₅₀ byly vypočteny z dávkových křivek pomocí programu v jazyce R využívajícího knihovnu drc.

20

Tab. 12. Cytotoxicita sloučenin vůči kožním fibroblastům, HaCaT a keratinocytům (IC₅₀, μM)

sloučenina	BJ	HaCaT	ARPE-19
kinetin	>100	>100	>100
kinetin mesylát	>100	>100	>100
isopentenyl	100	>100	>100
isopentenylmesylát	>100	>100	>100
6-benzylaminopurin	>100	>100	>100
6-benzylaminopurin mesylát	>100	>100	>100
<i>meta</i> -topolin (mT)	>100	>100	>100
<i>meta</i> -topolin mesylát	>100	>100	>100
<i>ortho</i> -topolin (oT)	98.7	>100	>100
<i>ortho</i> -topolin mesylát	>100	>100	>100
<i>trans</i> -zeatin (tZ)	>100	>100	>100
<i>trans</i> -zeatin mesylát	>100	>100	>100

Příklad 20: Inhibice senescence novými cytokininovými mesyláty testovaná na listových segmentech ozimé pšenice

5 Semena ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv. Hereward byla promyta pod tekoucí vodou apo 24 h a poté vyseta do mermikulitu nasyceného Knopovým živným roztokem. Nádoby se semeny byly umístěny do klimatizované růstové komory s 16/8 hodinovou světelnou periodou (světelná intenzita $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Po 7 dnech měly semenáčky vyvinutý první praporcový list a druhý list začínal prorůstat. Z prvních listů vždy od 5 rostlin byly odebrány vrchové sekce dlouhé přibližně 10 35 mm, které byly zkráceny tak, aby jejich váza byla přesně 100 mg. Bazální konce těchto listových segmentů byly umístěny do jamek mikrotitračních polystyrénových destiček obsahujících 150 μL roztoku testované látky. Destičky byly umístěny do plastového boxu vystlaného filtračním párem, který byl nasycen vodou za účelem vytvoření maximální vzdušné vlhkosti. Po 96 hodinách inkubace ve tmě při 25 °C byly listové segmenty vyjmuty a chlorofyl extrahován v 5 ml 80 % 15 ethanolu (v/v). Objem vzorku byl poté doplněn na 5 mL přidáním 80% ethanolu. Absorbance extraktů byla měřena při 665 nm. Jako kontroly byly měřeny rovněž chlorofylové extrakty z listů a listových vrcholů inkubované v deionizované vodě. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z 5-ti opakování a celý experiment byl zopakován minimálně 2x. Ze získaných dat byla vybrána koncentrace s nejvyšší aktivitou u každé testované sloučeniny. Relativní aktivity sloučenin při této 20 koncentraci byly vypočítány a nachází se v tabulce 13. Aktivita získaná pro 10^{-4} M 6-benzylaminopurin (BAP) byla stanovena jako 100%. Cytokinin, které byly testovány, byly nejprve rozpuštěny v DMSO a pak byl roztok vyředěn na 10^{-3}M destilovanou vodou. U těch krystalických solí cytokininových mesylátů, které to umožňovaly (BAP mesylát, *meta*-topolin mesylát, kinetin mesylát) nebyly rozpouštěny v DMSO, ale rovnou byl připravován 10^{-3}M roztok 25 v destilované vodě. Tento zásobní roztok byl pak ředěn na koncentrace v rozmezí 10^{-8}M až 10^{-4}M . Finální koncentrace DMSO v médiu, pokud bylo použito nepřevýšila 0.2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 13 a ukazují, že některé krystalické soli cytokinin mesylátů dokonce vedly ke zvýšení cytokininové aktivity v senescenčním testu ve srovnání s volnými bázemi těchto cytokininů.

30

Tab. 13. Vliv nových cytokininových mesylátů na oddálení senescence v dekapitovaných segmentech listů *Triticum aestivum* cv. Hereward ve tmě.

testovaná sloučenina	koncentrace s nejvyšší aktivitou ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	aktivita (%) [$10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP = 100%]
6-benzylaminopurin (BAP)	10^{-4}	100 ($\pm 9,5$)
6-benzylaminopurin mesylát	10^{-4}	108 ($\pm 10,7$)
6-(2-hydroxybenzylamino)purin – <i>ortho</i> -topolin (oT)	10^{-4}	67 ($\pm 6,7$)
6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	69 ($\pm 9,1$)
6-(3-hydroxybenzylamino)purin – <i>meta</i> -topolin (mT)	10^{-4}	117 (± 11)
6-(3-hydroxybenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	119 (± 13)
6-(3-methoxybenzylamino)purin	10^{-4}	101 (± 9)
6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	125 (± 8)
6-furfurylaminopurin (Kinetin)	10^{-4}	103 (± 12)
6-furfurylaminopurin (Kinetin) mesylát	10^{-4}	110.9 (± 11)
Isopentenyladenin (iP)	10^{-4}	93 ($\pm 10,8$)
Isopentenyladenin mesylát	10^{-4}	95 ($\pm 12,6$)
Dihydrozeatin (DHZ)	10^{-4}	81 ($\pm 9,2$)
Dihydrozeatin mesylát	10^{-4}	82 ($\pm 9,7$)
<i>trans</i> -zeatin (tZ)	10^{-4}	110 ($\pm 13,2$)
<i>trans</i> -zeatin mesylát	10^{-4}	114 ($\pm 12,8$)

6-(2-fluorobenzylamino)purin	10^{-4}	169 (± 20)
6-(2-fluorobenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	175 (± 18)
6-(3-fluorobenzylamino)purin	10^{-4}	200 (± 25)
6-(3-fluorobenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	210 (± 23)
6-(4-fluorobenzylamino)purin	10^{-4}	95,5 ($\pm 3,5$)
6-(4-fluorobenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	98 (± 12)
6-(2-chlorobenzylamino)purin	10^{-4}	116,5 ($\pm 6,5$)
6-(2-chlorobenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	122 (± 13)
6-(3-chlorobenzylamino)purin	10^{-4}	82 (± 2)
6-(3-chlorobenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	82 (± 7)
6-(2-methoxybenzylamino)purin	10^{-4}	269 (± 12)
6-(2-methoxybenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	271 (± 18)
6-(3-methoxybenzylamino)purin	10^{-4}	178 (± 16)
6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	184 (± 21)
6-(2-methylbenzylamino)purin	10^{-4}	158 (± 29)
6-(2-methylbenzylamino)purin mesylát	10^{-4}	157 (± 14)
6-(2,4-difluorobenzylamino)purin (2,4diFBAP)	10^{-5}	139 (± 2)
6-(2,4difluorobenzylamino)purin mesylát	10^{-5}	141 (± 13)
6-(3,5-difluorobenzylamino)purin (3,5diFBAP)	10^{-5}	156 (± 4)
6-(3,5-difluorobenzylamino)purin mesylát	10^{-5}	168 (± 9)

Příklad 21: Testování vlivu nových cytokininových mesylátů na buněčné dělení rostlinných buněk

- 5 Stimulační vliv nově připravených cytokininových mesylátů byl testován v kalusovém biotestu za použití cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Tento cytokinin-dependentní kalus *Nicotiana tabacum* L.cv. Wisconsin 38 byl udržován při 25 °C na modifikovaném mediu Murashige-Skoog (MS) obsahujícím na 1 litr 4 μmol kyseliny nikotinové, 2,4 μmol pyridoxin hydrochloridu, 1,2 μmol thiaminu, 26,6 μmol glycinu, 1,37 μmol glutaminu, 1,8 μmol myo-inositolu, 30 g sacharózy, 8 g
- 10 agaru, 5,37 μmol NAA a 0,5 μmol BAP. Subkultivace probíhala každé tři týdny. 14 dní před započítáním biotestu byl kalus přenesen na medium bez BAP. Stimulační růstová aktivita byla stanovena na základě nárůstu čerstvé hmoty kalusu po 4 týdnech kultivace. Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován min 2x. Ze získaných dat byla vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této
- 15 koncentraci (tab. 14). Aktivita při koncentraci 10^{-5} M 6-benzylaminopurinu byla postulována jako 100%. Zkoumané látky byly rozpouštěny v DMSO a roztok byl zředěn na 10^{-3} M destilovanou vodou. U těch krystalických solí cytokininových mesylátů, které to umožňovaly (BAP mesylát, *meta*-topolin mesylát, kinetin mesylát) nebyly rozpouštěny v DMSO, ale rovnou byl připravován 10^{-3} M roztok v destilované vodě. Tento zásobní roztok byl dále ředěn na potřebné koncentrace
- 20 pohybující se v rozmezí 10^{-8} M až 10^{-4} M. Výsledná koncentrace DMSO nepřekročila 0,2% a neovlivnila tak biologickou aktivitu zkoumaných sloučenin. Výsledky v tabulce 14 ukazují, že krystalické soli cytokininových mesylátů vedou ke zvýšení cytokininové aktivity v kalusovém testu ve srovnání s klasickými bázemi těchto cytokininů.

- 25 **Tab. 14.** Vliv nových cytokininových mesylátů na růst cytokinin-dependentního tabákového kalusu *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38

	testovaná sloučenina	koncentrace s nejvyšší aktivitou (mol.l^{-1})	aktivita (%) [$10^{-5} \text{mol.l}^{-1}$ BAP = 100%]
1.	6-benzylaminopurin (BAP)	10^{-5}	100 (± 13)
2.	6-benzylaminopurin (BAP) mesylát	10^{-5}	104 (± 11)

3.	6-(2-hydroxybenzylamino)purin – <i>ortho</i> -topolin (oT)	10 ⁻⁵	86 (±15)
4.	6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁵	87 (±16)
5.	6-(3-hydroxybenzylamino)purin – <i>meta</i> -topolin (oT)	10 ⁻⁵	105 (±23)
6.	6-(3-hydroxybenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁵	111 (±21)
7.	isopentenyladenin (iP)	10 ⁻⁵	93 (±14)
8.	isopentenyladenin mesylát	10 ⁻⁵	95 (±17)
9.	dihydrozeatin (DHZ)	10 ⁻⁵	78 (±18)
10.	dihydrozeatin mesylát	10 ⁻⁵	78 (±21)
11.	<i>trans</i> -zeatin (tZ)	10 ⁻⁵	109 (±21)
12.	<i>trans</i> -zeatin mesylát	10 ⁻⁵	111 (±22)
13.	6-(2-fluorobenzylamino)purin	10 ⁻⁵	111 (±21)
14.	6-(2-fluorobenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁵	110 (±15)
15.	6-(3-fluorobenzylamino)purin	10 ⁻⁵	135 (±8)
16.	6-(3-fluorobenzylamino)purinmesylát	10 ⁻⁵	137 (±15)
17.	6-(4-fluorobenzylamino)purin	10 ⁻⁵	122 (±12)
18.	6-(4-fluorobenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁵	126 (±16)
19.	6-(2-chlorobenzylamino)purin	10 ⁻⁵	93 (±4)
20.	6-(2-chlorobenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁵	97 (±6)
21.	6-(3-chlorobenzylamino)purin	10 ⁻⁵	94 (±6)
22.	6-(3-chlorobenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁵	101 (±12)
23.	6-(2-methoxybenzylamino)purin	10 ⁻⁵	79 (±5)
24.	6-(2-methoxybenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁵	82 (±8)
25.	6-(3-methoxybenzylamino)purin	10 ⁻⁶	76 (±20)
26.	6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁶	83 (±14)
27.	6-(2-methylbenzylamino)purin	10 ⁻⁶	118 (±3)
28.	6-(2-methylbenzylamino)purin mesylát	10 ⁻⁶	121 (±11)

Příklad 22: Účinek cytokininových mesylátů na *in vitro* a *post vitro* multiplikaci (množení) a zakořeňování růže (*Rosa multiflora*)

- 5 Účelem tohoto experimentu bylo zjistit, zda jsou nové cytokininové mesyláty prakticky využitelné ve tkáňových kulturách. Byl studován index množení a *post vitro* účinky. Růže (*Rosa hybrida*) byly pěstovány v 500 ml nádobách se šroubovacím uzávěrem. Každá nádoba obsahovala 100 ml autoklávaného kultivačního media Murashige a Skoog (120 °C, 20 min). Rostliny byly kultivovány při teplotě 24±2 °C a světelné periodě 16 h při 40 μM m⁻² s⁻¹ PAR. Základní medium
- 10 obsahovalo mikroelementy, makroprvky a vitamíny podle Murashige and Skooga (1962), 95 μM NaFeEDTA, 555 μM myo-inositolu, 111 mM sacharózy, 1,332 mM glycinu, 684 μM L-glutaminu a 7g/l agaru. Toto medium bylo doplňováno 10 μM BAP mesylátu, mT mesylátu, and 3MeOBAP mesylátu a pro srovnání s příslušnými volnými bázemi odpovídajících cytokininů. Kontrolní medium neobsahovalo žádný cytokinin. Po uplynutí osmi týdnů byl stanoven přírůstek nových
- 15 prýtů na jeden explantát, stejně jako počet kořenů na jeden explantát a celková délka kořenů na jeden explantát. Po odstranění kořenů byly explantáty (skupiny prýtů) přeneseny do substrátu. Po 4 týdnech aklimatizace byl znovu stanoven počet kořenů a jejich celková délka na jeden explantát. Podle předpokladu neměly rostliny pěstované na médiu neobsahujícím cytokininy téměř žádné nové
- 20 prýty. Původní explantáty vyrostly v kvalitní jednotlivé výhony, ale nezakořeňovaly dobře (viz tabulka 14). Explantáty rostoucí na cytokininových mesylátech se vyznačovaly vysokým indexem množení (velké množství nových prýtů) a ve srovnání s volnými bázemi i lépe zakořeňovaly. Použití cytokininových mesylátů vedlo ke zvýšení všech sledovaných parametrů v rostlinné kultuře ve srovnání s volnými cytokininovými bázemi.

- 25 Tab. 15. Vliv cytokinin mesylátů na *in vitro* a *post vitro* množení a zakořeňování růže *Rosa multiflora*.

Cytokinin	In vitro				Ex vitro	
	počet nových výhonů na explant	počet květů na explant	počet kořenů na explant	celková délka na explant (cm)	počet kořenů na rostlinu	celková délka rostliny (cm)
kontrola	0.2	0.03	0.8	1.2	4.6	17.1
6-benzylaminopurin	3.8	0.00	0.0	0.0	0.6	1.1
6-benzylaminopurin mesylát	4.1	0.00	0.0	0.0	0.9	1.4
6-(3-hydroxybenzylamino)purin	2.1	0.16	0.0	0.0	1.4	3.8
6-(3-hydroxyamino)purin mesylát	2.4	0.17	0.0	0.0	1.8	4.3
6-(3-methoxybenzylamino)purin	4.3	0.03	0.0	0.0	1.7	4.1
6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát	4.5	0.02	0.0	0.0	1.9	4.5

Příklad 23: Zvýšení výnosu zrna a počtu produktivních odnoží jarního ječmene (var. Francin)

- 5 Jarní ječmen (odrůda Francin), byla v roce 2019 na lokalitě v Olomouci, ošetřena postřikem látek – označených BAP (benzylaminopurin), *meta*-topolin mesylátu a BAP mesylátu. Výsevek byl 3,5 milionu klíčivých semen, pokus byl založen v 5 randomizovaných opakováních pro každou variantu, kontrola byla neošetřená varianta. Pokus probíhal podle metodiky GEP (Good Experimental Practise), velikost jednotlivých parcel byla 10 m². Aplikace látek byla provedena v
10 možnosti 300 l/ha, v růstové fázi BBCH 31-33 (začátek sloupkování). Koncentrace testovaných látek v postřikové jiši byla 5 µMol. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 15 níže.

Tab. 16: Účinek látek BAP, *meta*-topolin mesylátu and BAP mesylátu na jarní ječmen.

název sloučeniny (varianta)	Kontrola (neošetřeno)	BAP	<i>m</i> -topolin mesylát	BAP mesylát
koncentrace		5 uMol	5 uMol	5 uMol
aplikace (BBCH)		BBCH 31-33	BBCH 31-33	BBCH 31-33
Výnos zrna (t/ha) při 14 % vlhkosti	7,42	7,42	8,01	7,74
% srovnáno s kontrolou	100	100,13	108,03	104,34
<i>T-Test</i>		0,747	0,443	0,418
Silné odnože (počet)	1,8	2,8	2,45	2,75
% srovnáno s kontrolou	100	155,56	136,11	152,78
<i>T-Test</i>		0,001	0,018	0,001
Střední odnože (počet)	2,1	1,7	1,25	1,35
% srovnáno s kontrolou	100	80,95	59,52	64,29
<i>T-Test</i>		0,149	0,008	0,004
Slabé odnože (počet)	1,85	2,1	1,8	2,25
% srovnáno s kontrolou	100	113,51	97,3	121,62
<i>T-Test</i>		0,534	0,878	0,165
SUMA odnoží	5,75	6,6	5,5	6,35
% srovnáno s kontrolou	100	114,78	95,65	110,43

<i>T-Test</i>		<i>0,069</i>	<i>0,581</i>	<i>0,134</i>
Výška rostlin	82,8	82,5	83,1	83,2
% srovnáno s kontrolou	100	99,64	100,36	100,48
<i>T-Test</i>		*	*	*
počet klasů na čtvereční metr	676,8	752	721,6	758,4
% srovnáno s kontrolou	100	111,11	106,62	112,06
<i>T-Test</i>		<i>0,15</i>	<i>0,39</i>	<i>0,094</i>

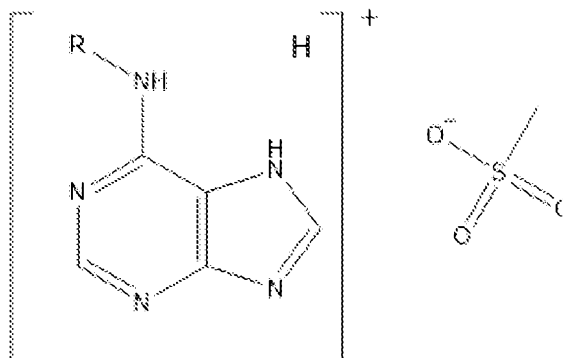
Foliární aplikace všech cytokininových derivátů, zvýšila počet silných (produktivních) odnoží (o 36,11 až 55,56 % nad úroveň kontroly), zatímco počet středních odnoží poklesl. Výnos zrna se zvýšil po aplikaci látek *meta*-topolin mesylát a BAP mesylát (108,03 a 104,34 % na kontrolu).

5. Jakou pozitivní kontrola byl použit BAP, který výnos zrna neovlivnil. U všech testovaných variant, byla pozorována vyšší hustota rostlin na čtverečním metru (106,62 – 112,06 % na kontrolu).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mesylát *N*⁶-substituovaného adeninového derivátu obecného vzorce I,

5



(I)

- 10 kde R je vybrán ze skupiny obsahující C3-C15 cykloalkyl, furfuryl, allyl, 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl, 3-methylbut-2-en-1-yl, 4-hydroxy-3-methylbutyl, 4-hydroxy-1,3-dimethylbut-2-en-1-yl, 4-hydroxy-1,3-dimethylbutyl, benzyl; kde cykloalkyl, allyl, benzyl a furfuryl mohou být nesubstituovány nebo volitelně substituovány 1 až 3 substituenty vybranými ze skupiny obsahující hydroxy, halogen, methyl, hydroxymethyl a methoxy.

- 15 2. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1, vybraná ze skupiny zahrnující 6-furfurylamino-purin mesylát, 6-(2-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(3-chlorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(3-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(4-fluorbenzylamino)purin mesylát, 6-(2-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-hydroxybenzylamino)purin mesylát, 6-(2-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-methoxybenzylamino)purin mesylát, 6-(3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-benzylamino-purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(Z)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(E)-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(Z)-(4-hydroxy-1,3-dimethylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(E)-(4-hydroxy-1,3-dimethylbut-2-en-1-ylamino)purin mesylát, 6-(4-hydroxy-3-methylbutylamino)purin mesylát a 6-(4-hydroxy-1,3-dimethylbutylamino)purin mesylát.

- 25 3. Sloučenina vzorce I podle nároku 1, vybraná ze skupiny obsahující:

30 - krystalický benzylamino-purin mesylát mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 6.2; 10.0; 15.2; 15.7; 18.6; 18.8; 19.3; 20.4; 23.5; 23.8; 24.4; 27.6 $\pm$ 0.2° 2-theta;

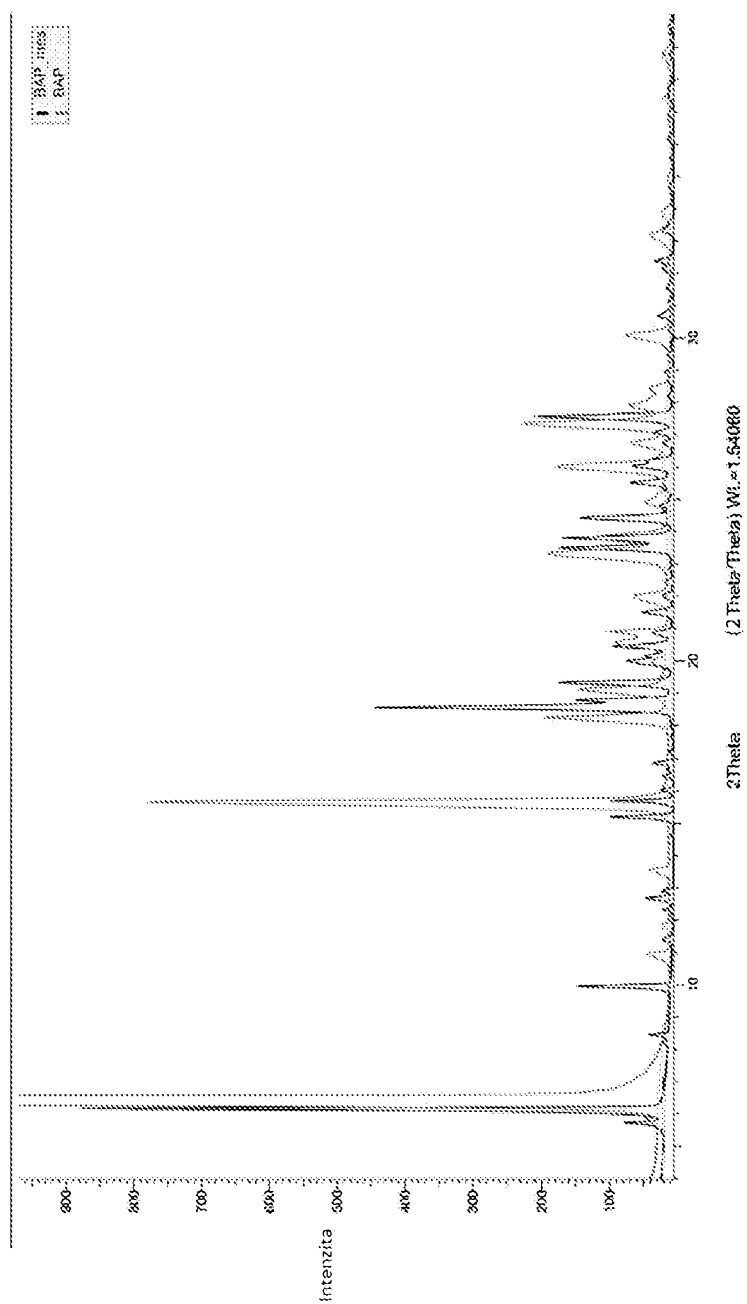
35 - krystalický meta-topolin mesylát mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 8.1; 9.7; 13.1; 15.6; 16.8; 17.6; 19.1; 19.5; 22.2; 24.6; 24.8; 24.9; 25.7 $\pm$ 0.2° 2-theta;

40 - krystalický ortho-topolin mesylát mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 9.8; 12.1; 16.8; 17.8; 18.3; 18.3; 20.7; 23.3; 24.1; 25.1; 26.8 $\pm$ 0.2° 2-theta;

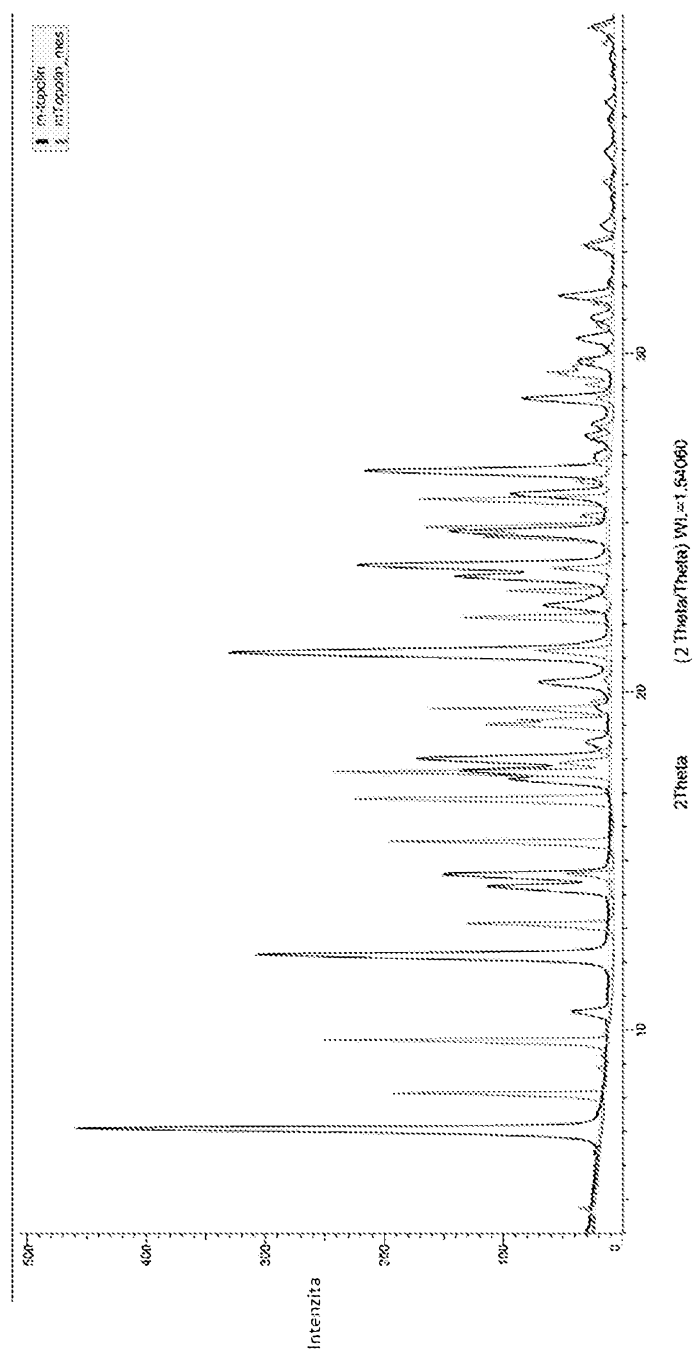
- krystalický kinetin mesylát mající charakteristické reflexe ve spektru rentgenové práškové difrakce měřené zářením CuK α : 6.2; 18.9; 19.8; 20.4; 22.6; 23.9; 27.7; 27.8 $\pm$ 0.2° 2-theta.

4. Použití sloučenin obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro ochranu rostlinných buněk *in vivo* a *in vitro* proti oxidativnímu a elektrofilnímu stresu; a/nebo
5 jako antioxidantů pro inhibici lipidové, proteinové a DNA peroxidace v rostlinách *in vivo* nebo *in vitro*.
5. Použití sloučenin obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro zvýšení výnosu užitkových rostlin, zlepšení zakořeňování, zvýšení počtu odnoží, zvýšení multiplikace a/nebo oddálení senescence rostlin, zejména v produkci zemědělských plodin, především obilovin, řepy,
10 malvic, peckovic a drobného ovoce, luštěnin, olejovin, tykvovitých, vláknitých rostlin, citrusů, zeleniny nebo rostlin jako tabák, ořechy, lilek, cukrová třtina, čaj, vinná réva, chmel, banány, přírodní kaučuk, léčivé rostliny, a okrasné rostliny.
6. Použití sloučenin obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 ve tkáňových kulturách jako růstově-regulačních a prodiferenciačních faktorů, ke stimulaci buněčné proliferace a morfogeneze, k potlačení nežádoucích fyziologických poruch, jako jsou hyperhydricita, nekróza
15 vzrostných vecholů, tvorba chimér, inhibice tvorby kořenů během aklimatizace a časná senescence.
7. Použití sloučenin obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 jako růstového regulátoru při *in vitro* klonování rostlinných či živočišných zárodečných buněk a embryí, s
20 výhodou oocytů, a k množení a diferenciaci embryí.
8. Použití sloučenin obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro inhibici nebo oddálení senescence rostlinných buněk a celých rostlin; a/nebo pro zlepšení celkového vzhledu a
25 kondice rostlin, konkrétně rostlinných epidermálních a mezofylových buněk, a také pro inhibici, oddálení nebo redukci žloutnutí, ztráty chloroplastů a chlorofylu; a/nebo pro omlazení rostlinných buněk a/nebo stimulaci buněčné proliferace a/nebo jejich diferenciaci v organismu.
9. Zemědělské a/nebo biotechnologické přípravky, **vyznačující se tím**, že obsahují alespoň
30 jednu sloučeninu obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, a alespoň jedno rozpouštědlo, nosič a/nebo pomocnou látku.

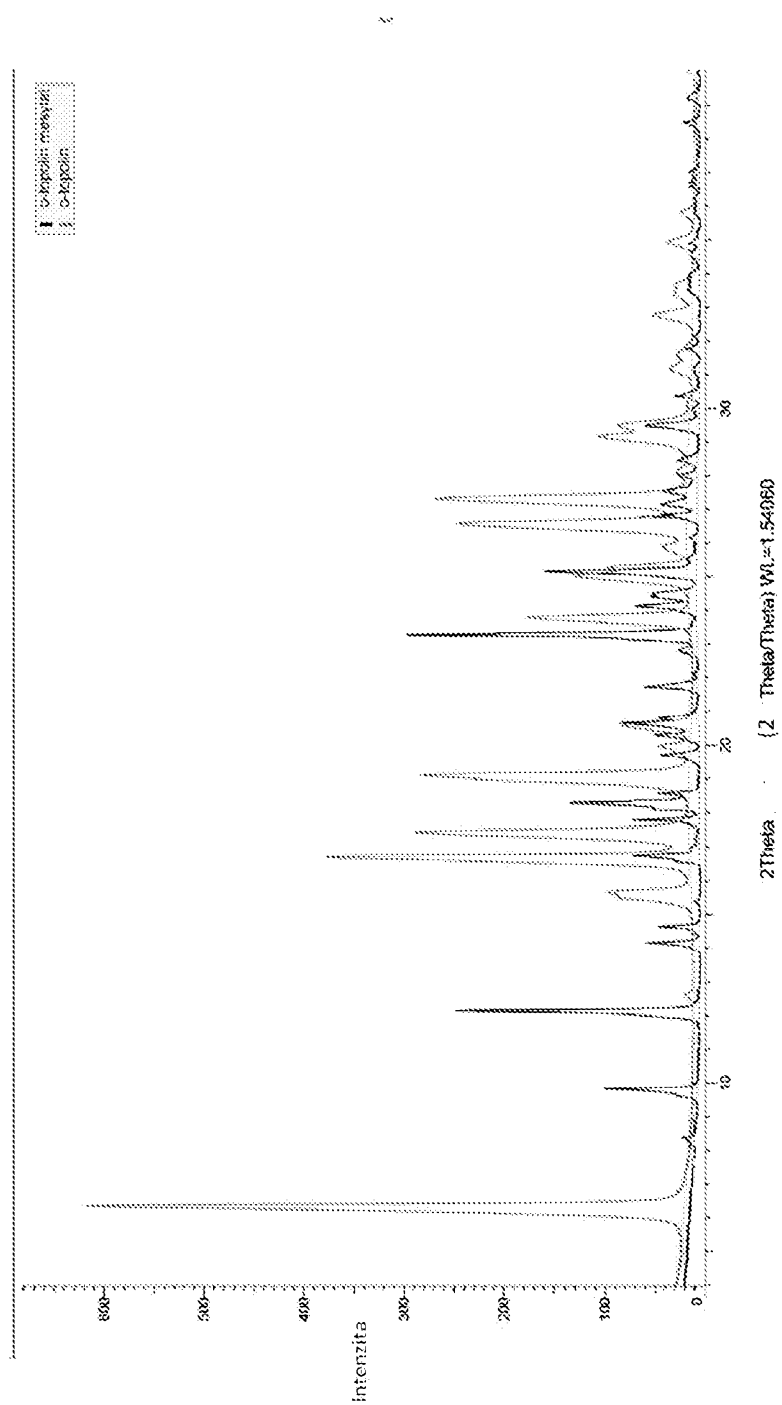
6 výkresů



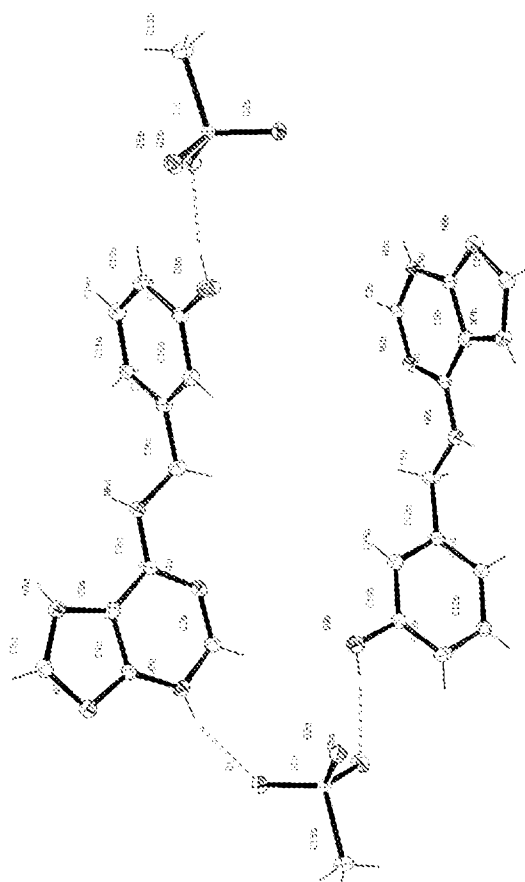
Obr. 1



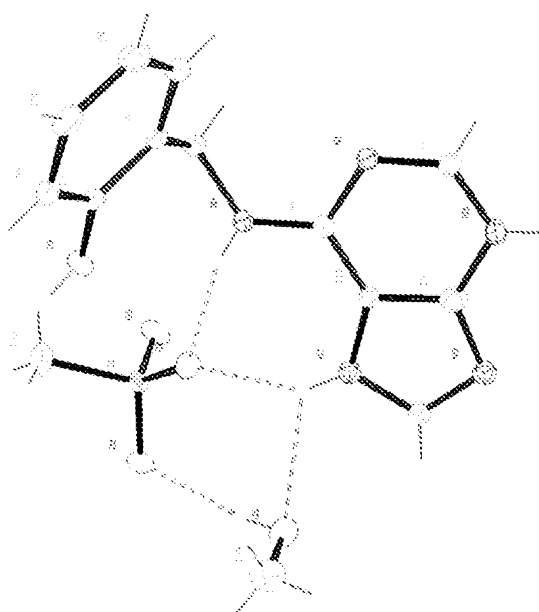
Obr. 2



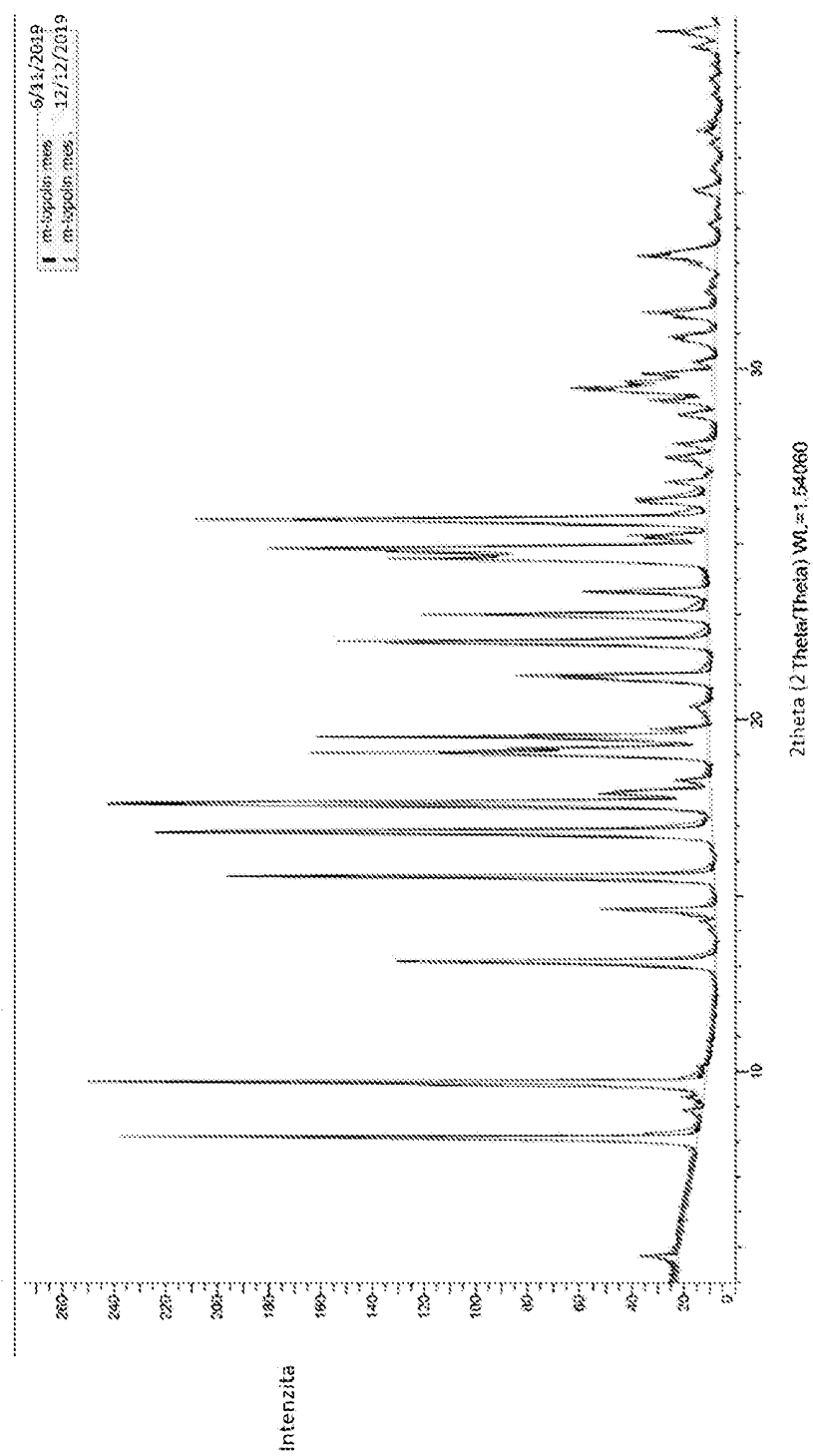
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6