

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2007-691

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/00 (2006.01)

A01N 43/54 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSL OVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.10.2007**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.04.2009**
(Věstník č. 15/2009)

(71) Přihlašovatel:

Univerzita Palackého, Olomouc, CZ
Freie Universität Berlin, 14195 Berlin, DE

(72) Původce:

Spíchal Lukáš, Olomouc, CZ
Popa Igor, Olomouc, CZ
Voller Jiří, Brno-Bystřec, CZ
Doležal Karel, Olomouc, CZ
Strnad Miroslav, Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

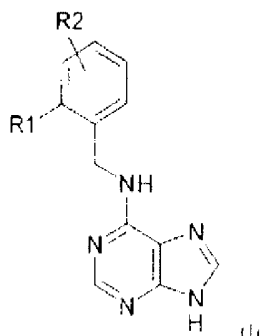
Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle
3, Praha 5, 15000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové
deriváty pro použití jako antagonisté
cytokininových receptorů a přípravky
obsahující tyto sloučeniny**

(57) Anotace:

Vynález se týká substituovaných 6-(alkylbenzylamino)purinových derivátů obecného vzorce I pro použití jako antagonistů cytokininových receptorů, ve kterých R1 znamená substituent vybraný ze skupiny zahrnující hydroxyl, amino, nitro, thio a alkyl skupinu, R2 znamená 1 až 4 alkyl skupiny. Vynález se týká rovněž přípravků obsahujících tyto sloučeniny.



CZ 2007 - 691 A3

Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů a přípravky obsahující tyto sloučeniny

Oblast techniky

Vynález se týká substituovaných 6-(alkylbenzylamino)purinových derivátů, jejich použití jako antagonistů cytokininových receptorů a přípravků obsahujících tyto sloučeniny.

Dosavadní stav techniky

Cytokinininy jsou rostlinné hormony, které hrají klíčovou úlohu v rozdílných aspektech regulace růstu a vývoje. Celá skupina zahrnuje chemikálie s rozdílnými stupni strukturální podobnosti, z nichž některé se vyskytují přirozeně v rostlinách, kdežto jiné byly připraveny chemicky (Mok & Mok Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 89-118, 2001). Přirozené cytokinininy jsou adeninové deriváty, které je možné klasifikovat podle postranního řetězce na isoprenoidní nebo aromatické. Důležitými představiteli těchto dvou tříd jsou zeatin a 6-benzylaminopurin.

Cytokinininy jsou centrálními regulátory buněčného cyklu a indukce buněčného dělení je považována za diagnostickou pro tuto skupinu rostlinných hormonů. Molekulární podstata této aktivity je pochopena pouze částečně a může se lišit u různých buněčných typů. Bylo prokázáno, že cytokinininy kontrolují defosforylaci tyrosinu a aktivují p34^{cdc2}-podobnou H1 histonovou kinasu (Zhang et al., Planta 200: 2-12, 1996), stejně jako transkripčně aktivují *cyklin D3* (Riou-Khamlichi et al. Science 283: 1541-1544, 1999). Některé z důležitých fyziologických a vývojových procesů jakými jsou tvorba a aktivita apikálního meristému, vývoj květů, přerušení dormance pupenů a klíčení semen, které jsou kontrolovány cytokinininy, mají přinejmenším funkční vazby s mechanismy kontroly buněčného cyklu.

Jak rostliny rozpoznávají cytokinininy bylo po dlouhou dobu záhadou. Zcela nedávno se však podařilo identifikovat několik cytokininových receptorů v *Arabidopsis* (Inoue et al. Nature 409: 1060-1063, 2001) a *Zea mays* (Yonckura-Sakakibara et al. Plant Physiol. 134: 1654-1661, 2004). *Arabidopsis* má tři cytokininové receptory, AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4. Všechny jsou membránově-lokalizované sensorové histidin kinasy s extracelulární ligand-vazebnou doménou a cytoplasmatickou His-kinasovou doménou. Bylo rovněž ukázáno, že cytokininový signál je transmitován několikakrokovým fosfát-přenosovým systémem, který byl známý u prokaryot a nižších eukaryot. U vyšších eukaryot jsou dvoučlenné signální dráhy známe pouze u rostlin (Ferreira & Kieber, Curr. Opin. Plant Biol. 8: 518-525, 2005). Vývoj

agonistů a antagonistů určitého fyziologického účinku je důležitý pro studium mechanismu účinku biologicky aktivních přirozených látek. Potenciální cytokininové antagonisty byly navrženy na základě domněnky, že se (1) aktivní cytokininy mohou vázat na jeden nebo více buněčných receptorů a (2) že bude možné připravit sloučeniny, které mají minimální cytokininovou aktivitu, avšak vysoký stupeň strukturální podobnosti umožňující jim kompetovat o dostupná receptorová vazebná místa, čímž omezí biologickou aktivitu cytokininů. Účinný přirozeně se vyskytující cytokinin N⁶-isopentenyladenin posloužil jako základ úvodních studií vztahů mezi strukturou a aktivitou. Modifikace heterocyklického purinového systému přinesla první analoga s antagonistickou aktivitou, která významně redukovala cytokininovou aktivitu v biotestech (Skoog & Armstrong, Annu. Rev. Plant Physiol. 21:359-384, 1970; Skoog et al., Phytochemistry 6:1169-1192, 1967). Identifikace třídy cytokininových antagonistů racionálními postupy naznačila, že další strukturálně příbuzné heterocyklické sloučeniny mohou mít cytokininovou antagonistickou aktivitu. Proto byla připravena řada substituovaných pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidinů, pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinů, s-triazinů, N-benzyl-N'-fenylmočovin a N-arylkarbamátů, které byly testovány na schopnost inhibovat cytokininy stimulované procesy v různých biotestech, jež prokázaly řadu látek jako potenciální anticytokininy (Hecht, Proc. Natl. Acad. Sci USA 68: 2608-2610, 1971; Skoog et al. Phytochemistry 12:25-37, 1973; Shimizu et al. J. Agric. Food Chem. 37:236-240, 1989, Iwamura et al. Biochim. Biophys. Res. Commun. 57:412-416, 1974; Hecht et al. 1976: US4, 282, 361; Skoog et al. 1981: US3, 988, 338). Vzhledem ke strukturální podobnosti s přirozenými cytokininy a vzhledem k jejich antagonistickým účinkům, které byly reverzibilní v závislosti na zvyšujících se koncentracích cytokininů bylo předpokládáno, že tyto sloučeniny fungují skrze interakci se společným molekulárním cílem, tedy cytokininovými receptory (in Mok & Mok, CRC Press, Boca Raton, USA, pp.43-55, 1994). Nicméně, přímý důkaz, že cytokininové receptory jsou místem cytokinin-anticytokininové interakce chyběl, protože cytokininové receptory byly v té době neznámé. Nedávný objev a pochopení cytokininového signálu nás motivoval k přezkoumání anticytokininového mechanismu účinku. Nejprve jsme prokázali, že reprezentativní anticytokininy nejsou kompetitivními inhibitory dvou cytokininových receptorů z *Arabidopsis*. S použitím velmi účinného anticytokininu 3-methyl-7-pentylaminopyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu jsme prokázali, že tato sloučenina inhibuje progres v buněčném cyklu a vyvolává změny připomínající účinek inhibitorů cyklin-dependentních kinas (CDK). Potvrdili jsme rovněž inhibici CDK anticytokininy u rostlin a lidí vazbou anticytokininu do ATP-vazebného místa lidské CDK2 (Spíchal et al. J. Biol. Chem. 282:14356-63, 2007).

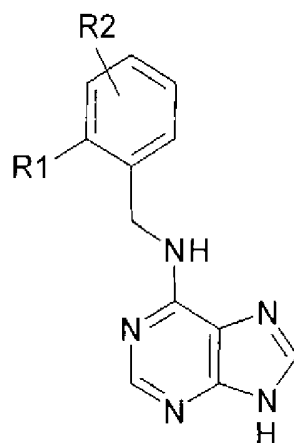
Ze současných prací je patrné, že percepce cytokininů je nezbytným krokem v regulaci mnoha aspektů růstu a vývoje rostlin. Studium rostlin pozbývajících funkční cytokininové receptory - jednoduchých, dvojitých a kompletních mutantů – ukazuje, že snížená schopnost vnímat cytokininy vede k ovlivnění růstu prýtu, oddálení senescence listů, zvětšení velikosti semen, zkrácení doby klíčení a zvětšení kořenového systému (Higuchi et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 101: 8821-8826, 2004; Nishimura et al. Plant Cell 16: 1365-1377, 2004; Riefler et al. Plant Cell 18: 40-54, 2006). Mutace způsobující vyřazení z funkce, nebo naopak zvýšenou aktivitu cytokininových receptorů luštěnin napomohly objasnění klíčového postavení percepce cytokininů při nodulaci (Gonzalez-Rizzo et al. Plant Cell 18: 2680-2693, 2006; Murray et al. Science 315: 101-104, 2007; Tirichine et al. Science 315: 104-107, 2007). Inhibitor percepce cytokininů – antagonist cytokininových receptorů – aplikovaný v určité době růstu rostlin, nebo orgánově specificky by tak mohl najít široké využití v zemědělství.

V nedávné době jsme objevili první generaci antagonistů cytokininových receptorů založenou na substituovaných 6-(alkylbenzylamino)purinech. Mezi nejslibnější substituenty, ve smyslu přípravy specifických antagonistů, patří 2-hydroxy, 2-amino and 2-nitro skupiny. Nově připravené látky vykazují zajímavé *in vivo* účinky na růst modelových rostlin.

Předmětem tohoto vynálezu jsou cytokininová analoga vykazující unikátní růstově-regulační účinky a selektivitu vůči cytokininovým receptorům, která jsou netoxická pro živočišné buňky.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I



I

ve kterém

R1 znamená substituent vybraný ze skupiny zahrnující hydroxyl, amino, nitro, thio a alkyl skupinu,

R2 znamená 1 až 4 alkyl skupiny, stejné nebo různé,

a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy,

ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami,

pro použití jako antagonisty cytokininových receptorů.

Výše uvedené generické skupiny mají významy uvedené v následující legendě, přičemž amino znamená skupinu $-NH_2$,

nitro znamená skupinu $-NO_2$,

thio znamená skupinu $-SH$,

hydroxyl znamená skupinu $-OH$,

alkyl znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 5 uhlíkových atomů.

Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I ze skupiny zahrnující: 6-(2-amino-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-4-methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-5-methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-5-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-5-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-nitro-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-nitro-4-methylbenzylamino)purin, 6-(2-thio-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-thio-5-methylbenzylamino)purin, 6-(2-thio-3-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,5-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,4-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,6-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,4,5-trimethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3,5-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3,6-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,5-diethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,6-diethylbenzylamino)purin,

a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy,

ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami,

pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou substituované 6-(methylbenzylamino)purinové deriváty zahrnující zejména 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin a 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů pro morfogenní účinky vedoucí ke zvětšení kořenového systému rostlin.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů pro urychlení nalévání semen a zvětšení velikosti semene a plodů rostlin a hub a pro zkrácení doby klíčení semen rostlin.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů v tkáňových kulturách k regulaci proliferace a morfogeneze.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů, zejména pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů

nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů při produkci užitkových rostlin, s výhodou obilovin (pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, žito, oves, čirok a další druhy), řep (cukrová a krmná řepa); malvic, peckovic a bobulovin (jablka, hrušky, švestky, broskve, mandle, jahody, maliny a ostružiny); vikvovitých rostlin (bob, čočka, hrách, soja); olejnin (řepka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokos, *Ricinus*, kakaový bob, podzemnice olejná); lilkovitých rostlin (dýně, okurky, melouny); přadných rostlin (bavlna, len, konopí, juta); citrusů (pomeranče, citrony, grapefruity, mandarinky); zeleniny (špenát, skořice, kafr) nebo rostlin jakými jsou tabák, ořešák, baklažán, cukrová třtina, čajovník, réva vinná, chmel, banány a přírodní kaučukovníkové a léčivé rostliny stejně tak jako okrasné rostliny. Plodiny zahrnují ty, které poskytují toleranci vůči třídám růstových faktorů konvenčním křížením nebo metodami genetického inženýrství. Plevely, jejichž růst může být kontrolován, zahrnují jak jednoděložné tak dvouděložné druhy, například *Stellaria*, *Nasturtium*, *Agrostis*, *Digitaria*, *Avena*, *Setaria*, *Sinapis*, *Lolium*, *Solanum*, *Echinochloa*, *Scirpus*, *Monochoria*, *Sagittaria*, *Bromus*, *Alopecurus*, *Sorghum halepense*, *Rottboellia*, *Cyperus*, *Abutilon*, *Sida*, *Xanthium*, *Amaranthus*, *Chenopodium*, *Ipomoea*, *Chrysanthemum*, *Galium*, *Viola* and *Veronica*.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití při přípravě přípravků pro klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí.

Vynález dále zahrnuje přípravky pro klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí obsahující alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I či sůl takovéto sloučeniny s alkalickým kovem, amoniakem či aminem, ve formě racemátu nebo opticky aktivního isomeru, nebo jeho adiční soli s kyselinou, a pomocné látky.

Předmětem vynálezu jsou substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití při přípravě růstově-regulačních přípravků.

Vynález rovněž zahrnuje růstově-regulační přípravky obsahující alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I či sůl takovéto sloučeniny s alkalickým kovem, amoniakem či

aminem, ve formě racemátu nebo opticky aktivního isomeru, nebo jeho adiční soli s kyselinou, a pomocné látky.

Použití substituovaného 6-(alkylbenzylamino)purinového derivátu obecného vzorce I nebo jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních soli s kyselinami pro přípravu přípravku pro inhibici cytokininových receptorů.

Vynález dále zahrnuje přípravky pro inhibici cytokininových receptorů obsahující alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I či sůl takovéto sloučeniny s alkalickým kovem, amoniakem či aminem, ve formě racemátu nebo opticky aktivního isomeru, nebo jeho adiční soli s kyselinou, a pomocné látky.

Sloučeniny obecného vzorce I jsou používány v nemodifikované formě, nebo s výhodou společně s pomocnými látkami běžně využívanými v přípravcích. Jsou přednostně používány koncentráty aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, ředěné emulze, rozpustné prášky, prach, granuláty, krémy, gely, olejové suspenze a rovněž enkapsulované produkty, např. polymerní substance. Ve vztahu k typu přípravku je určena i metoda aplikace, například sprejování, atomizace, poprach, rozptýl, nátěr a polévání, která je zvolena ve vztahu k předurčenému použití a převažujícím okolnostem. Přípravky mohou být sterilizovány anebo obsahují další přídavné látky neutrální povahy, například konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla anebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, hnojiva, či donory mikrohnojiv nebo další přípravky za účelem získání speciálních účinků.

Sloučenina obecného vzorce I může být smíchána s dalšími růstovými regulátory za účelem dosažení synergického účinku.

Přípravky

Přípravky obsahující sloučeniny obecného vzorce I (aktivní složka) nebo jejich soli 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).

V závislosti na povaze sloučeniny obecného vzorce I nebo její soli, která má být formulována, vhodné povrchově aktivní látky jsou neiontové, kationtové a/nebo aniontové povrchově aktivní látky a jejich směsi mající dobré emulzifikační, dispergační a zvlhčovací vlastnosti.

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

Pro přípravu formulací obsahujících antagonisty cytokininových receptorů na bázi substituovaných 6-(alkylbenzylamino)purinových derivátů jsou podle tohoto vynálezu používána smáčedla konvečně používaná při přípravách přípravků, 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, MunichNienna, 1981 and M. and J. Ash, "Encyclopedia of Surfactants", Vol-III, Chemical Publishing Co., New York, 1980-81.

Formulace přípravku s cytokininovým antagonistou obsahuje váhově od 0,1 do 99 % (w/w), zejména pak od 0,1 do 95 % (w/w) aktivní složky odpovídající látce nebo směsi látek obecného vzorce I, přičemž obsahuje i od 5 do 99,9 % směsi přísad či farmaceutických nosičů, a to v závislosti na způsobech aplikace, a popřípadě obsahuje i váhově od 0,1 do 25 % smáčedla.

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 epoxidizované rostlinné oleje (epoxidizovaný palmový olej 0;1, řepkový nebo olivový olej), odpěňovače, např. silikonový olej, konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla anebo emulgátory, viskozitní činidla, pojiva, lepidla, a také hnojiva a další aktivní přísady. S výhodou jsou využívány 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 60 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 složka: 0,1 až 30 %, s výhodou 0,1 až 15 %

pevný nosič: 99,9 až 70 %, s výhodou 99,9 až 85 %

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, při ochraně rostlin před škodlivým vlivem růstových regulátorů se používají rozdílné metody a technologie, kterými jsou například následující:

i) Obalování osiva

a) Obalování osiva smáčivou práškovou formulací sloučeniny obecného vzorce I nebo její soli, a to mícháním v nádobě až do stejnorodé distribuce na povrchu semen (suché obalování). Při takové proceduře je přibližně 1 až 500 g sloučeniny obecného vzorce I nebo její soli, (4 g až 2 kg smáčivého prášku) používáno na 100 kg osiva.

b) Obalování osiva emulzifikovaným koncentrátem sloučeniny obecného vzorce I nebo její soli, v souladu s metodou a) (mokrý obalování).

c) Obalování osiva cestou máčení semen po dobu 1 až 72 h v tekutině obsahující od 100 do 1000 ppm sloučeniny obecného vzorce I nebo její soli, a s výhodou následného usušení semen (imerní obalování).

Obalování semen nebo ošetření klíčících semen jsou upřednostňovanou metodou aplikace, protože ošetření aktivní látkou je určeno cílovou plodinou. Obecně jsou látky vzorce 1 nebo jejich soli používány v množství od 1 do 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

Kapalná formulace směsi růstového regulátoru a antidota je používána ve váhovém poměru jednoho k druhému od 10:1 do 1 :100, rychlost aplikace růstového regulátoru od 0,005 do 5,0 kg na hektar. Taková cisternová aplikace směsi se provádí před anebo po seti.

iii) Aplikace do semenné brázdy

Sloučenina obecného vzorce I nebo její sůl, je zavedena do otevřené brázdy oseté semenem ve formě emulzifikovaného koncentrátu, smáčivého prášku nebo granulí. Jakmile je semenná brázda zaklopena, je růstový regulátor aplikován cestou obvykle používanou při preemergentním procesu.

iv) Kontrolované uvolňování aktivních látek

Sloučeniny obecného vzorce I nebo jejich soli, jsou aplikovány v roztoku k minerálním granulovaným nosičům nebo polymerizovaným granulím (močovina, formaldehyd) a jsou vysušeny. V případě, že je to žádoucí, tak se provádí obalování, které umožňuje postupné uvolňování látky v měřitelných množstvích po určité specifické periodu (obalované granule).

Seznam vyobrazení

Obr. 1 ukazuje vazebný test s CRE1/AHK4- a AHK3-obsahujúcimi membránami *E. coli*. (A)

Vazba 2 nM 3HtZ byla testována v kombinaci se stoupající koncentrací kompetitoru 8, nebo v přítomnosti neznačeného *trans*-zeatinu (tZ; pozitivní kontrola). (B) Dvojitě reciproké vynesení ukazující kompetitivní charakter inhibice vazby 3HtZ do receptoru CRE1/AHK4 látkou 8.

Obr. 2 ukazuje efekt látky 8 na cytokininem indukovanou expresi genu *P_{ARR5::GUS}*. (A) *P_{ARR5::GUS}* transgenenní semenáčky *Arabidopsis* inkubované s 2,5 μ M 6-benzylaminopurinem (BA) za přítomnosti, či absence 5 μ M látky 8; DMSO (0.1%) bylo testováno jako kontrola rozpouštědla použitého pro rozpouštění aplikovaných látek. (B) Kvantitativní vyjádření koncentračně závislého inhibičního účinku látky 8 na indukci exprese genu *P_{ARR5::GUS}* spuštěné 1 μ M BA.

Obr. 3 znázorňuje antagonistický efekt látky 8 ve standardních cytokininových biotestech. (A) Efekt na proliferaci buněk cytokinin-depenentního kalusu *Arabidopsis*. (B) Efekt na cytokininem stimulovanou tvorbu betacyaninu v hypokotylech *Amaranthu* ve tmě. (C) Efekt na cytokininem stimulovanou retenci chlorofylu v listech pšenice.

Obr. 4 ukazuje *in vivo* účinek látky 8 na formování laterálních kořenů. (A) Počet laterálních kořenů formovaných semenáčky *Arabidopsis* (divoký typ) 10 dnů po vyklíčení – zleva: DMSO kontrola, tvorba postranních kořenů v přítomnosti cytokininu BA, látky 8, a kompetiční efekt při aplikaci obou látek. (B) Nárůst počtu postranních kořenů u rostlin *Arabidopsis* divokého typu a receptorových mutantů rostoucích na médiu obsahujícím látku 8.

Obr. 5 ukazuje *in vivo* účinek látky 8 na klíčení. Zkrácení doby klíčení semen *Arabidopsis* divokého typu kultivovaných na médiu obsahujícím různé koncentrace látky 8 po přemístění ze tmy na bílé světlo (režim 16 hod den/8 hod noc).

Příklady provedení vynálezu

Výchozím materiálem pro přípravu sloučenin obecného vzorce **1** je 6-chlorpurin nebo 6-brompurin. Výchozí substituované benzylaminy, které nebyly komerčně dostupné (ostatní získány od Sigma Aldrich nebo Fluorochem), byly připraveny z odpovídajících aldehydů v přítomnosti katalyzátoru. Ty, které mají více methyl skupin, mohou být s výhodou připraveny z příslušných methylbenzaldehydů. Hydroxyderiváty se připravují demethylací odpovídajících methoxyderivátů 48% HBr v N₂ atmosféře.

Elementární analýzy (C, H a N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Fissons Instruments). Na zjišťování bodu tání byl použit přístroj BÜCHI Melting Point B-540. Analytická tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na destičkách silikagelu 60 WF₂₅₄ (Merck), v mobilní fázi CHCl₃:MeOH:konc. NH₄OH (8:2:0,2, v/v/v). ES+ hmotová spektra byla naměřena za použití přímého nástřiku na Waters ZMD 2000 hmotovém spektrometru. Hmotnostní interval při měření byl 10 - 1500 amu. Spektra byla měřena za

použití cyklických skenů o délce 3,0 sekundy, při napětí na vstupní štěrbině 25 V a teplotě vypařovacího bloku 150 °C, desolvatační teplotě 80 °C a průtoku desolvatačního plynu 200 l/hodinu. Získaná data byla zpracována pomocí programu MassLynx data system. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance AV 300 při teplotě 300 K a frekvenci 300,3 MHz (^1H) respektive 75,48 MHz (^{13}C). Vzorky byly připraveny rozpuštěním daných látek v DMSO- d_6 . Tetramethylsilan (TMS) byl použit jako interní standard.

Příklad 1

Příprava 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu

3 mmol 6-chlorpurinu byly rozpuštěny v 15 ml butanolu a byly přidány 4 mmol 2-hydroxy-3-methylbenzylaminu a 5 mmol triethylaminu. Roztok byl zahříván na 90 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byl surový produkt odfiltrován a rekrystalován v etanolu. T.t. 276-277 °C. TLC: chloroform-metanol-amoniak (90:9:1): žádné nečistoty; bez výchozích látek, HPLC čistota: 98+ %, Výtěžek 92 %.

Tabulka 1

Látky připravené postupem podle příkladu 1

PŘIPRAVENÉ LÁTKY		CHN ANALÝZY [%]	MS ANALÝZA-ZMD [M-H] ⁻ a) [M+H] ⁺ b)	
1	6-(2-amino-3-methylbenzylamino)purin	C=60,8; H=5,7; N=32,7	253	255
2	6-(2-amino-4-methylbenzylamino)purin	C=61,2; H=5,6; N=32,9	253	255
3	6-(2-amino-5-methylbenzylamino)purin	C=61,2; H=5,6; N=32,9	253	255
4	6-(2-amino-3-ethylbenzylamino)purin	C=62,4; H=6,0; N=31,1	267	269
5	6-(2-amino-5-ethylbenzylamino)purin	C=62,5; H=6,0; N=31,2	267	269
6	6-(2-amino-3-isopropylbenzylamino)purin	C=63,8; H=6,1; N=29,4	281	283
7	6-(2-amino-5-isopropylbenzylamino)purin	C=63,6; H=6,3; N=29,8	281	283
8	6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin	C=60,9; H=5,4; N=27,3	254	256
9	6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin	C=60,5; H=5,3; N=27,2	254	256
10	6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin	C=60,8; H=5,3; N=27,4	254	256
11	6-(2-hydroxy-6-methylbenzylamino)purin	C=60,8; H=5,3; N=27,2	254	256
12	6-(2-hydroxy-3-ethylbenzylamino)purin	C=62,4; H=5,5; N=25,9	268	270
13	6-(2-hydroxy-5-ethylbenzylamino)purin	C=62,3; H=5,5; N=25,8	268	270
14	6-(2-hydroxy-3-isopropylbenzylamino)purin	C=63,6; H=6,2; N=24,5	282	284
15	6-(2-nitro-3-methylbenzylamino)purin	C=54,7; H=4,3; N=29,3	283	285

16	6-(2-nitro-5-methylbenzylamino)purin	C=54,8; H=4,3; N=29,3	283	285
17	6-(2-nitro-3-ethylbenzylamino)purin	C=56,3; H=4,7; N=28,2	297	299
18	6-(2-thio-3-methylbenzylamino)purin	C=57,4; H=4,7; N=25,6	270	272
19	6-(2-thio-5-methylbenzylamino)purin	C=57,3; H=4,7; N=25,7	270	272
20	6-(2-thio-3-ethylbenzylamino)purin	C=58,3; H=5,2; N=24,6	284	286
21	6-(2-amino-3,5-dimethylbenzylamino)purin	C=62,5; H=5,9; N=30,9	267	269
22	6-(2-amino-3,6-dimethylbenzylamino)purin	C=62,3; H=5,8; N=30,7	267	269
23	6-(2-hydroxy-3,5-dimethylbenzylamino)purin	C=62,2; H=5,5; N=25,8	268	270
24	6-(2-hydroxy-3,4-dimethylbenzylamino)purin	C=62,3; H=5,5; N=25,9	268	270
25	6-(2-hydroxy-3,6-dimethylbenzylamino)purin	C=62,2; H=5,6; N=25,8	268	270
26	6-(2-hydroxy-3,4,5-trimethylbenzylamino)purin	C=63,2; H=5,9; N=24,5	282	284
27	6-(2-hydroxy-3,5-diethylbenzylamino)purin	C=64,0; H=6,6; N=23,2	296	298

Příklad 2

Testování agonistické aktivity na cytokininových receptorech

Escherichia coli kmene KMI001 nesoucí plasmid pIN-III-AHK4 nebo pSTV28-AHK3 byly pěstovány přes noc při 25 °C v M9 médiu obohaceném 0,1% kasaminovými kyselinami do OD₆₀₀~1. Prekultura byla naředěna 1:600 v 1 ml M9 média obsahujícího 0,1% kasaminových kyselin a k ní byl přidán 1 µl zásobního roztoku testované látky (10⁻⁷ M – 5 × 10⁻⁵ M) nebo rozpouštědla (DMSO, ethanol, methanol). Kultury byly dále kultivovány při 25 °C v mikrotitrační destičce, 200 µl na jamku, po dobu 17 h v případě CRE1/AHK4 kultury a 28 h v případě AHK3 kultury. Poté byly kultury zcentrifugovány a 50 µl alikvoty supernatantu byly přeneseny do mikrotitrační destičky obsahující 2 µl 50mM 4-methylumbelliferyl galaktosidu v každé jamce a následně inkubovány 1 h při 37 °C. Reakce byla zastavena přidavkem 100 µl 0,2 M Na₂CO₃. Fluorescence vzorků byla změřena spektrofotometrem Fluoroscan Ascent (Labsystems, Finsko) při vlnových délkách 365 nm (excitační) and 460 nm (emisní). Bylo stanoveno OD₆₀₀ zbylé kultury a aktivita β-galaktosidasy byla vyjádřena jako nmol 4-methylumbelliferonu × OD₆₀₀⁻¹ × h⁻¹.

Hodnoty EC₅₀, tedy koncentrace látky aktivující receptor z 50 %, byla spočtena ze získaných křivek odezvy. Látka účinkující jako cytokininový antagonistista by neměla aktivovat cytokininovou signální dráhu. V tabulce 2 jsou uvedené průměry ze tří opakování, celý test byl proveden nejméně dvakrát. Nově připravené 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce **I** vykazovaly výrazně sníženou

afinitu k cytokininovým receptorům v porovnání s kontrolním cytokininem *trans*-zeatinem.

Tabulka 2

Účinek nových látek na aktivaci cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana*
CRE1/AHK4 and AHK3.

Č.	Testované látky	EC50 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
		CRE1/AHK4	AHK3
	<i>trans</i> -zeatin	0.9	2.1
	6-(benzylamino)purin	19.7	18.2
1	6-(2-amino-3-methylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
2	6-(2-amino-4-methylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
3	6-(2-amino-5-methylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
4	6-(2-amino-3-ethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
5	6-(2-amino-5-ethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
8	6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin	n.i.	>100
9	6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
10	6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin	n.i.	>100
11	6-(2-hydroxy-6-methylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
12	6-(2-hydroxy-3-ethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
13	6-(2-hydroxy-5-ethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
15	6-(2-nitro-3-methylbenzylamino)purin	n.i.	>100
16	6-(2-nitro-5-methylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
17	6-(2-nitro-3-ethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
19	6-(2-thio-5-methylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
21	6-(2-amino-3,5-dimethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
23	6-(2-hydroxy-3,5-dimethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.
24	6-(2-hydroxy-3,4-dimethylbenzylamino)purin	n.i.	n.i.

n.i. znamená bez interakce

Příklad 3

Inhibice vazby přirozeného ligandu cytokininového receptoru 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinem (látko 8)

K vazebnému testu byly použity izolované membrány *E. coli* obsahující CRE1/AHK4 a AHK3 receptory (viz příklad 2). Membrány byly izolovány a vazebný test byl proveden postupem publikovaným Romanovem et al. (Romanov et al. Analytical Biochemistry 347:129-

134, 2005). V testu byl posuzován vliv stoupající koncentrace kompetitoru (látky 8) na vazbu radioaktivně značeného přirozeného ligandu *trans*-zeatinu (^3HtZ). Neznačený *trans*-zeatin (tZ) byl použit jako pozitivní a adenin jako negativní kontrola. Látka 8 snížila vazbu ^3HtZ na 50% v koncentraci 3 μM (obr. 1), zatímco ani 1000x vyšší koncentrace adeninu nebyla efektivní.

Příklad 4

Snížení indukce exprese cytokininového reportéru ARR5 vlivem aplikace cytokininového antagonisty 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinem (látko **8**)

Cytokininů specificky indukují expresi genu *ARR5*, který patří do rodiny typu A regulátorů odpovědi. *P_{ARR5}:GUS* (D'Agostino et al. Plant Physiol. 124: 1706-1717, 2000) transgenenní semenáčky *Arabidopsis* byly kultivované v MS médiu obsahujícím 2,5 μ M 6-benzylaminopurin (BA) za přítomnosti, či absence 5 μ M látky 8; DMSO (0.1%) bylo testováno jako kontrola rozpouštědla použitého pro rozpouštění aplikovaných látek. Semena byla sterilizována 70% ethanolem a potom přidána do jamek 6-jamkové desky (TPP, Švýcarsko) obsahujících 3 mL MS média. Desky byly uloženy ve 4 °C ve tmě za účelem synchronizace klíčení. Poté byly desky přeneseny do fytotronu (22 °C, 16h světlo/8h tma), kde pak byla po 2-3 dnech po vyklíčení provedena aplikace testovaných látek přímo do media rostlin. V případě kvalitativního stanovení byly rostliny inkubovány s testovanými látkami 4 h, v případě kvantitativního testu 17 h. Kvalitativní stanovení – barvení GUS bylo provedeno podle Jeffersona et al. (Jefferson et al. EMBO J. 6: 3901-3907, 1987). Rostliny byly nejprve zbaveny zelených barviv 1 h inkubací v 90% acetonu při 4 °C, poté bylo provedeno barvení substrátem X-Glc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid, sodná sůl) po dobu 40 min při 37 °C. Reakce byla zastavena přenesením rostlin do 70% ethanolu. Jak je patrné z obrázku 2A, látka 8 vyvolala snížení úrovně exprese cytokininového reportéru *ARR5:GUS* indukovanou cytokininem BA v kořeni i nadzemní části testovaných rostlin. Kvantitativní stanovení míry indukce genu *ARR5:GUS* bylo provedeno podle práce Romanova et al. (Romanov et al. FEBS Letters 515: 39-43, 2002). Po extrakci proteinů byla aktivita GUS (β -glukuronidasa) stanovena po inkubaci s fluorogenním substrátem MUG (4-methylumbelliferyl glukuronid; 1 h, 37 °C) měřením fluorescence při 365 nm a 460 nm (excitační a emisní vlnové délky), jak je detailně popsáno v práci Spíchal et al. (Spíchal et al. Plant and Cell Physiology 45: 1299-1305, 2004). Kvantitativní stanovení potvrdilo, že pokles indukce exprese *ARR5:GUS* 1 μ M BA je závislý na aplikaci vzrůstající koncentrace látky 8 (obr. 2B). Tento pokles dokazuje, že došlo

k zablokování percepcce cytokininu receptorem, byla tedy inhibována událost, která je lokalizována „up-stream“ vzhledem k odpovědi na účinek cytokininů.

Příklad 5

Testování vlivu nových látek na buněčné dělení rostlinných buněk

Stimulační vliv nově připravených derivátů byl testován v kalusovém biotestu za použití cytokinin-dependentního kalusu tabáku. Tento cytokinin-dependentní tabákový kalus *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38 byl udržován při 25 °C na modifikovaném mediu Murashige-Skoog (MS) obsahujícím na 1 litr: 4 μmol kys. 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 sacharosy, 8 g agaru, 5,37 μmol α-naftyloctové kyseliny a 0,5 μmol 6-benzylaminopurinu. Subkultivace probíhala každé 3 týdny. Čtrnáct dní před započítáním biotestu byl kalus přenesen na médium bez 6-benzylaminopurinu. 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 minimálně 2-krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látka kinetin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10⁻³ M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10⁻⁸ až 10⁻⁴ M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2 % a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu.

Ze získaných dat byla opět vypočítána maximální účinná koncentrace testované látky a její relativní účinnost v této koncentraci (Tab. 3). 10⁻⁶ M koncentrace kontrolní látky 6-benzylaminopurinu byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Látka účinkující jako cytokininový antagonist a by neměla mít stimulační vliv na buněčné dělení rostlinných buněk. Výsledky v tabulce 11 naznačují, že nově připravené 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I vykazovaly výrazný pokles až ztrátu cytokininové aktivity v kalusovém biotestu ve srovnání s klasickým cytokininem - 10⁻⁶ M koncentrace kontrolní látky 6-benzylaminopurinu byla postulována jako 100% biologické aktivity (BA).

Vliv nových antagonistů cytokininů na růst cytokinin-dependentního tabákového kalusu

Nicotiana tabacum L. cv. Wisconsin 38

č.	Testovaná sloučenina	maximální účinná koncentrace (mol.l ⁻¹)	aktivita (%) [10 ⁻⁶ mol.l ⁻¹ BA = 100%]
	6-(benzylamino)purin	10 ⁻⁶	100
1	6-(2-amino-3-methylbenzylamino)purin		n.a.
2	6-(2-amino-4-methylbenzylamino)purin		n.a.
3	6-(2-amino-5-methylbenzylamino)purin		n.a.
4	6-(2-amino-3-ethylbenzylamino)purin		n.a.
5	6-(2-amino-5-ethylbenzylamino)purin		n.a.
8	6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin	10 ⁻⁴	2 (±2)
9	6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin		n.a.
10	6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin	10 ⁻⁴	35 (±8)
11	6-(2-hydroxy-6-methylbenzylamino)purin	10 ⁻⁴	23 (±5)
12	6-(2-hydroxy-3-ethylbenzylamino)purin		n.a.
13	6-(2-hydroxy-5-ethylbenzylamino)purin		n.a.
15	6-(2-nitro-3-methylbenzylamino)purin		n.a.
16	6-(2-nitro-5-methylbenzylamino)purin		n.a.
17	6-(2-nitro-3-ethylbenzylamino)purin		n.a.
19	6-(2-thio-5-methylbenzylamino)purin	10 ⁻⁴	1.3 (±1)
21	6-(2-amino-3,5-dimethylbenzylamino)purin		n.a.
23	6-(2-hydroxy-3,5-dimethylbenzylamino)purin		n.a.
24	6-(2-hydroxy-3,4-dimethylbenzylamino)purin		n.a.

n.i. znamená neaktivní

Příklad 6

Testování nových látek v amarantovém biotestu

Pro studium cytokininové aktivity byl rovněž použit "amarantový" biotest v následující modifikaci. Semena *Amaranthus caudatus* var. Atropurpurea byla povrchově sterilizována 10% N-chlorbenzensulfonamidem (w/v) po dobu 10 min a poté promyta 5-krát deionizovanou vodou. Semena byla rozmístěna v 15 cm Petriho miskách s filtračním papírem saturovaným destilovanou vodou. Po 72 hodinách kultivace při 25 °C ve tmě byly ze semenáčků odstraněny kořeny. Tyto explantáty obsahující 2 kotyledony a hypokotyl byly umístěny do 5 cm Petriho misek na 2 vrstvy filtračního papíru nasyceného 1 ml inkubačního média obsahujícího 10 μmol

Na₂HPO₄-KH₂PO₄, pH 6,8, 5 μmol tyrosinu a testovaný cytokinin. Na misku bylo umístěno 20 explantátů. Veškeré manipulace byly prováděny pod zeleným světlem v temné komoře. Po 48 hodinách inkubace při 25 °C ve tmě byl betacyanin extrahován cestou zmrazení explantátů v 3,33 μM kyselině octové. Koncentrace betacyaninu byla stanovena porovnáním absorbancí při 537 a 620 nm a vypočtena pomocí vzorce $\Delta A = A_{537\text{nm}} - A_{620\text{nm}}$. Hodnoty byly vyneseny do grafů závislosti ΔA na koncentraci. Pět replikátů bylo připraveno pro každou testovanou koncentraci a daný test byl opakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byl použit jako kontrolní látka 6-benzylaminopurin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10⁻³ M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10⁻⁸ až 10⁻⁴ M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0,2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. 10⁻⁴ M koncentrace kontrolní látky 6-benzylaminopurinu byla postulována jako 100 % biologické aktivity.

Látka účinkující jako cytokininový antagonist a by neměla mít stimulační vliv na indukcii betacyaninu v amarantovém biotestu. Stejně jako v případě kalusového testu vykazovaly nově připravené 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce **I** výrazný pokles až ztrátu cytokininové aktivity ve srovnání s klasickým cytokininem 6-benzylaminopurinem (BA).

Příklad 7

Antisenescenční aktivity nových látek při testování v senescenčním biotestu na segmentech listů pšenice

Semena ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv. Hereward byla promyta pod tekoucí vodou po 24 hod. a poté vyseta do vermikulitu nasyceného Knopovým živným roztokem. Nádoby se semeny byly umístěny do klimatizované růstové komory s 16/8 hodinovou světelnou periodou (světelná intenzita $50 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a teplotou 15°C . Po 7 dnech měly semenáčky vyvinutý první praporcový list a druhý list začínal prorůstat. Z prvních listů vždy od 5 rostlin byly odebrány vrcholové sekce dlouhé přibližně 35 mm, které byly zkráceny tak, aby jejich váha byla přesně 100 mg. Bazální konce těchto 5 listových segmentů byly umístěny do jamek mikrotitračních polystyrenových destiček obsahujících 150 ml roztoku testovaného derivátu. Destičky byly umístěny do plastového boxu vystlaného filtračním papírem, který byl nasycen vodou za účelem maximální vzdušné vlhkosti. Po 96 hodinách inkubace ve tmě při 25°C byly listové sekce vyjmuty a chlorofyl extrahován v 5 ml 80% ethanolu zahřátím při 80°C po dobu

10 min. 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 opakování a celý experiment byl zopakován minimálně 2-krát. V každém experimentu byla použita jako kontrolní látka 6-benzylaminopurin, který je znám velmi vysokou cytokininovou aktivitou. Testované cytokininy byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a zásobní roztok doplněn vodou na 10^{-3} M. Tento zásobní roztok byl dále ředěn testovacím médiem v koncentračním rozsahu 10^{-8} až 10^{-4} M. Finální koncentrace DMSO v médiu nepřevýšila 0.2% a v této koncentraci neovlivňovala biologickou aktivitu testu. 10^{-4} M koncentrace kontrolní látky 6-benzylaminopurinu byla postulována jako 100% biologické aktivity.

Látka účinkující jako cytokininový antagonist by neměla mít pozitivní vliv na oddálení senescence v segmentech listů pšenice. Stejně jako v případě kalusového testu vykazovaly nově připravené 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce **I** výrazný pokles až ztrátu cytokininové aktivity ve srovnání s klasickým cytokininem 6-benzylaminopurinem (BA).

Příklad 8

Antagonistický efekt 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu (látko 8) v cytokininem
mediovaných procesech

Výše uvedené klasické biotesty (kalusový, amarantový, senescenční) byly dále použity pro ověření *in vitro* antagonistického účinku látky 8 na cytokininem mediované procesy. V testech byl použit cytokinin 0,5-1 μM BA k vyvolání cytokinin-dependentního efektu. Látka 8 byla aplikována buď samostatně v koncentraci 1 μM pro zjištění vlastní cytokininové aktivity, nebo v širší koncentrační škále od 10 nM – 10 μM v kombinaci s BA pro ověření antagonistického efektu. Jak je zřejmé z obr. 3, ve všech použitých biotestech látka 8 významně snižovala biologický účinek aktivního cytokininu 6-benzylaminopurinu (BA) aplikovaného v jeho optimální koncentraci. Síla antagonistického účinku byla závislá na zvyšující se koncentraci látky 8.

Příklad 9

In vivo účinek 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu (látko 8) na zvětšení kořenového systému modelové rostliny *Arabidopsis*

Cytokinininy jsou negativními regulátory růstu a vývoje kořenů. Rostliny *Arabidopsis* divokého typu, nebo transgenní rostliny se sníženou percepcí cytokininů byly pěstovány na MS médiu obsahujícím buď cytokinin 1 a 5 nM BA pro ověření inhibičního efektu cytokininů na zakládání postranních kořenů, nebo látku 8 v koncentraci 1 a 10 nM, nebo kombinaci těchto látek v koncentracích uvedených v obr. 4A. Jak je patrné z obr. 4A, cytokinin způsobil inhibici formování postranních kořenů. Aplikace látky 8 působila na tento efekt antagonisticky a vedla k obnovení přirozeného fenotypu u rostlin stáří 14 dnů od vyklíčení. V případě, že byla do média aplikována pouze látka 8 v submikromolárních koncentracích, docházelo ke zvětšení kořenového systému navýšením počtu postranních kořenů oproti kontrole. Z toho vyplývá, že látka 8 působí antagonisticky na endogenní hladiny cytokininů v kořenech modelových rostlin. U receptorových mutantů, které mají zachovaný vždy pouze jeden ze tří cytokininových receptorů byl efekt nejvýraznější u mutantu *ahk2ahk3*, což na *in vivo* úrovni potvrzuje, že látka 8 blokuje vazbu cytokininů do receptoru AIIK4 (obr. 4B).

Příklad 10

In vivo účinek 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purinu (látka 8) na klíčení semen modelové rostliny *Arabidopsis*

V průběhu klíčení semen bylo zjištěno, že semena inkubovaná na MS médiu obsahujícím látku 8 vyklíčila rychleji po přemístění ze tmy na světlo, než semena kontrolních rostlin (obr. 5). Po 30 hodinách vyklíčilo více než 60 % semen kultivovaných na médiu obsahujícím 1 nM látku 8, což představovalo dvojnásobné množství oproti kontrole, při vyšší koncentraci (10 nM) dosahoval počet vyklíčených semen až 80 %.

Stejně jako u předešlého příkladu se jedná o stejný efekt, který byl pozorovaný u receptorových mutantů se sníženou percepcí cytokininů (Ricfler et al, Plant Cell 18:40-45, 2006).

Příklad 11

In vitro cytotoxická aktivita nových derivátů

Jedním z předpokladů využití 6-(alkylbenzylamino)purinových derivátů v zemědělských aplikacích je absence toxického působení na člověka a zvířata. Standardním postupem je hodnocení toxicity látek na savcích, především lidských, buněčných liniích. Toxicita se mimo jiné projevuje snížením metabolické aktivity buňky, což je možné s výhodou

Sloučenina	Použitá buněčná linie / IC ₅₀ (μmol/L)					Maximální testovaná koncentrace (μmol/L)
	BJ	K-562	MCF7	HOS	G-361	
Kinetin	>100	>100	>100	>100	>100	100

isopentenyladenin	>100	>100	>100	>100	>100	100
benzyladenin	>100	>100	>100	>100	>100	100
<i>trans</i> -zeatin	>100	>100	>100	>100	>100	100
<i>meta</i> -topolin	>100	>100	>100	>100	>100	100
<i>ortho</i> -topolin	>100	>100	>100	>100	>100	100
Adenin	>100	>100	>100	>100	>100	100
8	>50	>50	>50	>50	>50	50
10	>100	>100	>100	>100	>100	100

Ze získaných výsledků vyplývá, že testované (alkylbenzylamino)purinové deriváty jsou v koncentračních rozmezích předpokládaných v zemědělských aplikacích netoxické.

Příklad 12

Sledování in vitro viability lidských diploidních fibroblastů pomocí MTT

MTT test je standardní kolorimetrickou metodou pro měření proliferace a přežívání buněk. Žluté MTT je v metabolicky aktivních buňkách redukováno na fialový formazan a ten je stanoven spektrofotometricky. Diploidní lidské fibroblasty SNF25 (19. pasáž) byly vysety do 96 jamkové mikrotitrační desky v počtu 5000 na jamku, po 6 hodinách bylo médium (DMEM obsahující 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 µg/ml streptomycinu a 10% fetálního telecího séra) odsáto a nahrazeno médiem obsahujícím testovanou látku v koncentračním rozmezí 0-100 µM. V případě nerozpustných látek byla maximální testovaná koncentrace upravena. Každá koncentrace byla testována v pentaplikátu. MTT bylo k buňkám přidáno po 72 hodinách (finální koncentrace 0,5 mg/ml) a inkubace probíhala 3 hodiny.

Absorbance vzniklého MTT byla po rozpuštění v DMSO změřena při vlnové délce 570 nm (referenční vlnová délka 650). Cytotoxický účinek byl vyjádřen jako $IC = (A_{\text{jamka s derivátem}} / A_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota IC_{50} , která odpovídá koncentraci látky způsobující 50 % redukcii mitochondriální aktivity byla vypočtena ze získaných dávkových křivek. Výsledky ukazuje tabulka 5.

Tabulka 5

Cytotoxicita nových sloučenin pro lidské diploidní fibroblasty

Sloučenina	IC_{50} (µmol/L)	Maximální testovaná koncentrace (µmol/L)
kinetin	>100	100

isopentenyladenin	>100	100
benzyladenin	>100	100
<i>trans</i> -zeatin	>100	100
<i>meta</i> -topolin	>100	100
<i>ortho</i> -topolin	>100	100
adenin	>100	100
8	>50	50
10	>100	100

Z výsledků testování vyplývá, že testované látky nejsou pro lidské diploidní fibroblasty v koncentracích předpokládaných pro zemědělské aplikace toxické.

Příklad 13

Přípravky

Přípravky obvykle obsahují od 0,1 do 99 % (w/w), zejména pak od 0,1 do 95 % (w/w) aktivní složky odpovídající látce nebo směsi látek obecného vzorce I, od 1 do 99,9 % (w/w) pevných nebo tekutých pomocných látek, a od 0,1 do 25 % (w/w), zejména od 0,1 do 25 % (w/w) surfaktantu. Zatímco komerční přípravky jsou obvykle formulovány jako koncentráty, koncový uživatel používá přípravek ředěný. Přípravek může zahrnovat i další komponenty jako stabilizátory, např. rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný kokosový olej 0;1, řepkový olej, podzemnicový olej), protipěňivé látky, např. silikonový olej, konzervační látky, látky regulující viskozitu, pojiva, látky zvyšující přilnavost, hnojiva, případně další aktivní složky. Preferované přípravky mají zejména toto složení (uvedena hmotnostní procenta):

<u>A1. Emulgovatelné koncentráty</u>	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	5%	10%	25%	50%
dodecylbenzensulfonát vápenatý	6%	8%	6%	8%
polyoxyethylovaný ricinový olej (polyglykol ether ricinového oleje)	4%	-	4%	4%
(36 mol ethylen oxid)				
oktylfenol polyglykol ether -	2 %	-	2 %	
(7-8 mol ethylen oxid)				
cyklohexanon	-	-	10 %	20 %
směs aromatických uhlovodíků	83 %	82 %	53 %	18 %
C ₉ -C ₁₂				

Emulze o vyžadované finální koncentraci mohou být získány z takového koncentrátu zředěním vodou.

<u>A2. Roztoky</u>	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	5 %	10 %	50%	90%
1-methoxy-3-(3-methoxy-propoxy)-propan	-	20 %	20%	-
polyethylenglykol MW 400	20%	10 %	-	-
N-methyl-2-pyrrolidon	-	-	30%	10%
směs aromatických uhlovodíků C ₉ -C ₁₂	75 %	60 %	-	-

Roztoky jsou vhodné k aplikaci ve formě mikrokapelek.

<u>A3. Smáčivé prášky</u>	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	5 %	25 %	50 %	80 %
lignosulfonát sodný	4 %	-	3 %	-
laurylsulfát sodný	2 %	3 %	-	4 %
diisobutylnaftalensulfonát sodný	-	6 %	5 %	6 %
oktylfenol polyglykol ether - (7-8 mol ethylen oxid)	1 %	2 %	-	-
vysoce disperzní kyselina křemičitá	1 %	3 %	5 %	10 %
kaolín	87 %	61 %	37 %	-

Aktivní složka je důkladně promísená s pomocnými látkami a směs je důkladně rozemleta ve vhodném mlýnu. Suspenzi libovolné koncentrace je možné získat smísením vzniklého prachu s vodou.

<u>A4. Potahované granule</u>	a)	b)	c)
Aktivní složka	0.1 %	5%	15%
vysoce disperzní kyselina křemičitá	0.9 %	2 %	2 %
anorganický nosič (0,1 -1 mm)	99.0 %	93 %	83 %
např. CaCO ₃ nebo SiO ₂			

Aktivní složka je rozpuštěna v methylenchloridu a nasprejována na nosič. Rozpouštědlo je odpařeno ve vakuu.

<u>A5. Potahované granule</u>	a)	b)	c)
Aktivní složka	0.1 %	5 %	15 %

polyethylenglykol MW 200	1.0 %	2 %	3 %
vysoce disperzní kyselina křemičitá	0.9 %	1 %	2 %
anorganický nosič	98.0 %	92 %	80 %

(AE 0,1 -1 mm)

např. CaCO_3 nebo SiO_2

Jemně rozemletá aktivní složka je v mixéru stejnoměrně nanесena na nosič zvlhčený polyethylenglykolem. Takto jsou získány neprašné granule.

<u>A6. Extrudované granule</u>	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	0.1 %	3 %	5 %	15 %
lignosulfonát sodný	1.5 %	2 %	3 %	4 %
karboxymethylcelulosa	1.4 %	2 %	2 %	2 %
kaolin	97.0 %	93 %	90 %	79 %

Aktivní složka je smíšena a rozemleta s pomocnými látkami a složka je zvlhčena vodou. Směs je extrudována a usušena v proudu vzduchu.

<u>A7. Prachy</u>	a)	b)	c)
Aktivní složka	0.1 %	1 %	5 %
talek	39.9 %	49 %	35 %
kaolin	60.0 %	50 %	60 %

Prachy k přímému použití jsou získány rozemletím aktivní složky s nosičem ve vhodném mlýnu.

<u>A8. Suspenzní koncentrát</u>	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	3%	10%	25%	50%
ethylen glykol	5 %	5 %	5 %	5%
nonylfenol polyglykol ether- (15 mol ethylen oxid)	1 %	2 %	-	
lignosulfonát sodný	3 %	3 %	4 %	5 %
karboxymethylcelulosa	1 %	1 %	1 %	1%
37 % vodný roztok formaldehydu	0.2 %	0.2 %	0.2 %	0.2%
emulze silikonového oleje	0.8 %	0.8 %	0.8 %	0.8%
voda	86 %	78 %	64 %	38%

Jemně rozemletá aktivní složka je smíchána s pomocnými látkami. Vzniklý suspenzní koncentrát umožňuje přípravu suspenze o požadované koncentraci zředěním vodou.

Příklad 14

Gel

Názvy složek jsou uváděny v souladu s terminologií registračních úřadů. Obsah složek je uváděn v gramech na 100 g.

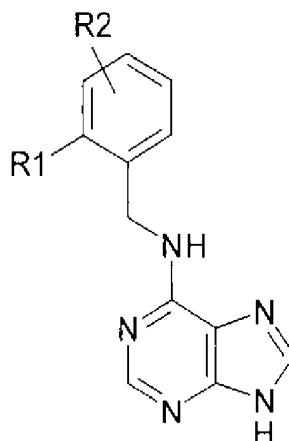
Gel		/100 g
Aktivní látka 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin(2OH3MeBAP)		1,0 g
butylhydroxytoluen	(Nipanox BHT)	0,2 g
butylparaben	(Nipabutyl)	0,2 g
diethylenglykol monoethyl ether	(Transcutol P)	10,0 g
bezvodá koloidní silika	(Zeopharm 177)	5,0 g
propylenglykol laurát	(Lauroglycol FCC)	83,6 g

Konzistence gelu může být dále modifikována přidáním bezvodé koloidní siliky.

Účinek aktivní látky může být zvýšen pomocí transdermálního systému Transcutol P/Lauroglycol FCC. Bezvodá koloidní silika pravděpodobně zpomalí penetraci účinné látky, což povede k protrahovanému účinku.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty obecného vzorce I



I

ve kterém

R1 znamená substituent vybraný ze skupiny zahrnující hydroxyl, amino, nitro, thio a alkyl skupinu,

R2 znamená 1 až 4 alkyl skupiny, stejné nebo různé,

a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy,

ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních soli s kyselinami,

pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů.

2. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle nároku 1 vybrané ze skupiny zahrnující 6-(2-amino-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-4-methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-5-methylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-5-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-5-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-methylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-methylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-4-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-6-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-5-isopropylbenzylamino)purin, 6-(2-nitro-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-nitro-4-methylbenzylamino)purin, 6-(2-thio-3-methylbenzylamino)purin, 6-(2-thio-5-methylbenzylamino)purin, 6-(2-thio-3-ethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,5-

dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,4-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,6-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,4,5-trimethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3,5-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-amino-3,6-dimethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,5-diethylbenzylamino)purin, 6-(2-hydroxy-3,6-diethylbenzylamino)purin, a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů.

3. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle nároku 2 vybrané ze skupiny zahrnující 6-(2-hydroxy-3-methylbenzylamino)purin a 6-(2-hydroxy-5-methylbenzylamino)purin a jejich soli s alkalickými kovy, amoniakem či aminy ve formě racemátů nebo opticky aktivních isomerů, nebo jejich adičních solí s kyselinami, pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů.

4. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů pro morfogenní účinky vedoucí ke zvětšení kořenového systému rostlin.

5. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů pro urychlení nalévání semen a zvětšení velikosti semene a plodů rostlin a hub a pro zkrácení doby klíčení semen rostlin.

6. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů ve tkáňových kulturách k regulaci proliferace a morfogeneze.

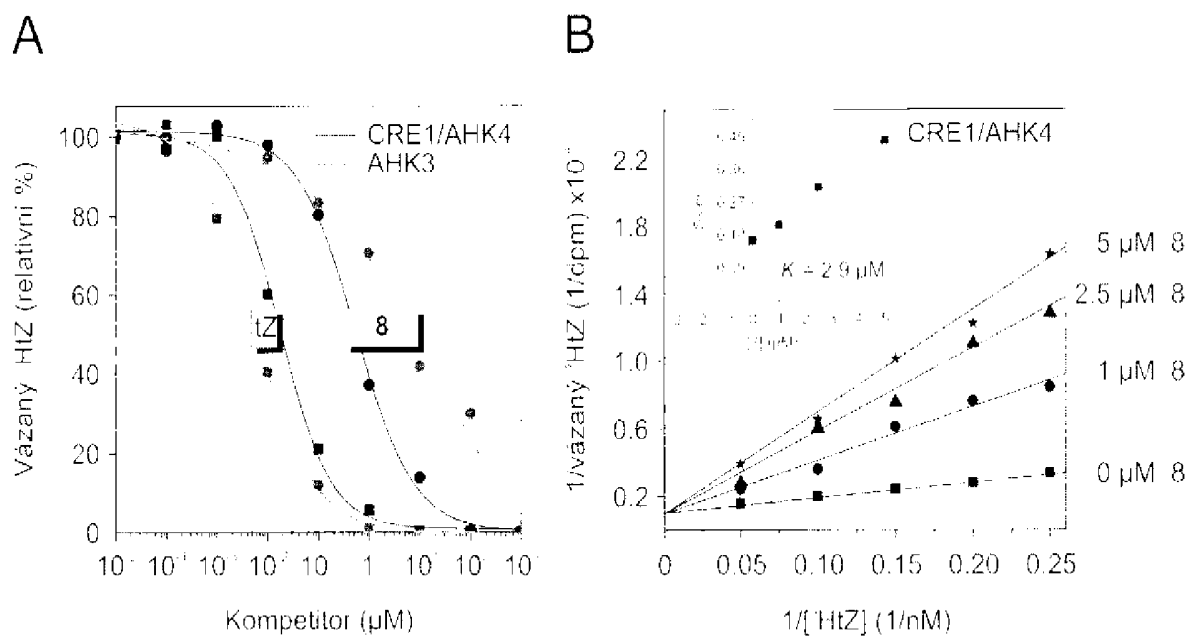
7. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů pro zvýšení výnosu a kvality zemědělských produktů.

8. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů při produkci užitkových rostlin, zejména obilovin, řep, malvic, peckovic a bobulovin, vikvovitých rostlin, olejnin, lilkovitých rostlin, prádňích rostlin, citrusů, zeleniny, nebo rostlin vybraných ze skupiny zahrnující tabák,

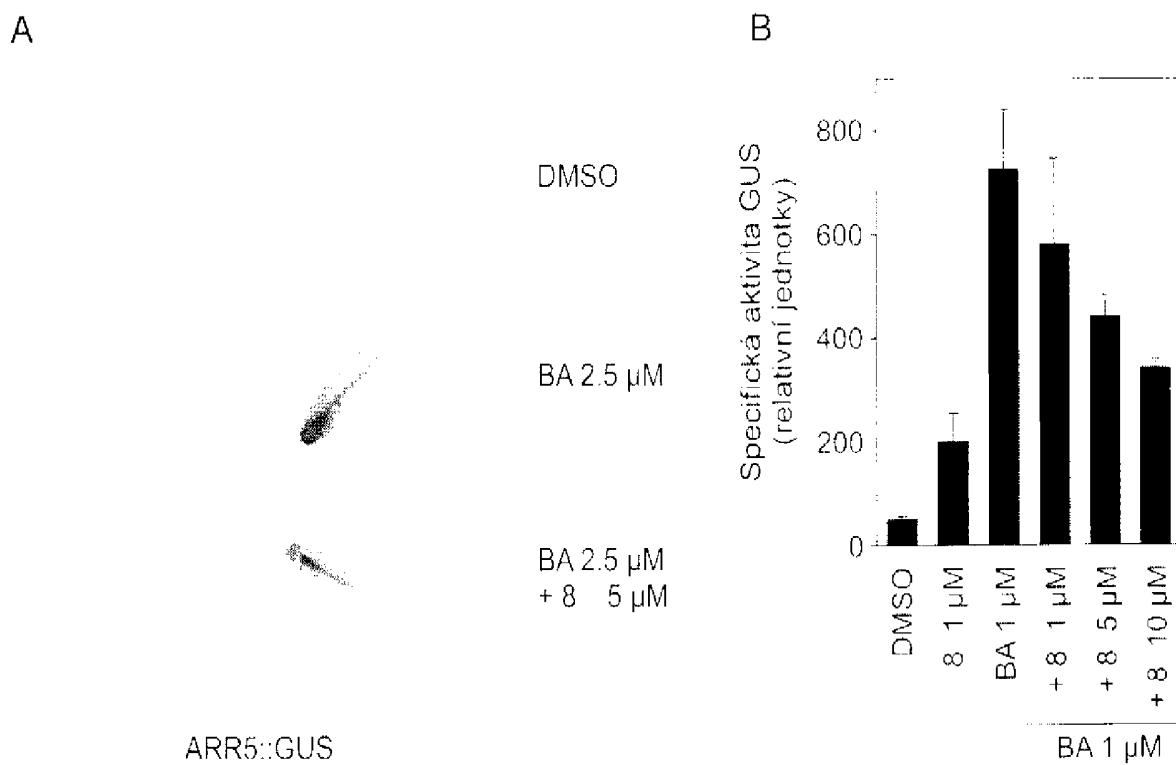
orešák, baklažán, cukrová třtina, čajovník, réva vinná, chmel, banány, přírodní kaučukovníkové a léčivé rostliny a okrasné rostliny.

9. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako antagonisté cytokininových receptorů při kontrole růstu plevelů.
10. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití při přípravě přípravků pro klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí.
11. Přípravky pro klonování rostlinných i savčích zárodečných buněk a embryí, vyznačující se tím, že obsahují alespoň jeden substituovaný 6-(alkylbenzylamino)purinový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 a pomocné látky.
12. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití při přípravě růstově-regulačních přípravků.
13. Růstově-regulační přípravky, vyznačující se tím, že obsahují alespoň jeden substituovaný 6-(alkylbenzylamino)purinový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 a pomocné látky.
14. Substituované 6-(alkylbenzylamino)purinové deriváty podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití při přípravě přípravků pro inhibici cytokininových receptorů.
15. Přípravky pro inhibici cytokininových receptorů, vyznačující se tím, že obsahují alespoň jeden substituovaný 6-(alkylbenzylamino)purinový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 a pomocné látky.

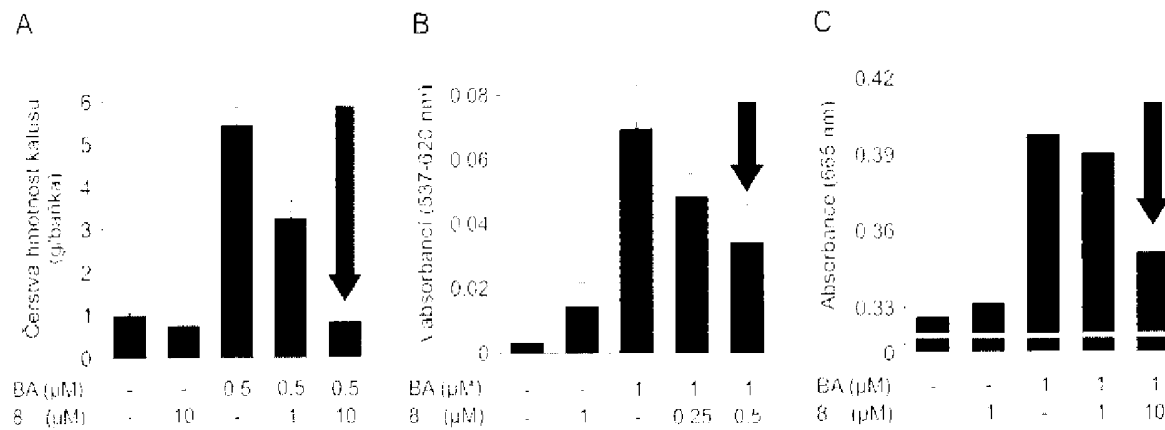
Obr. 1



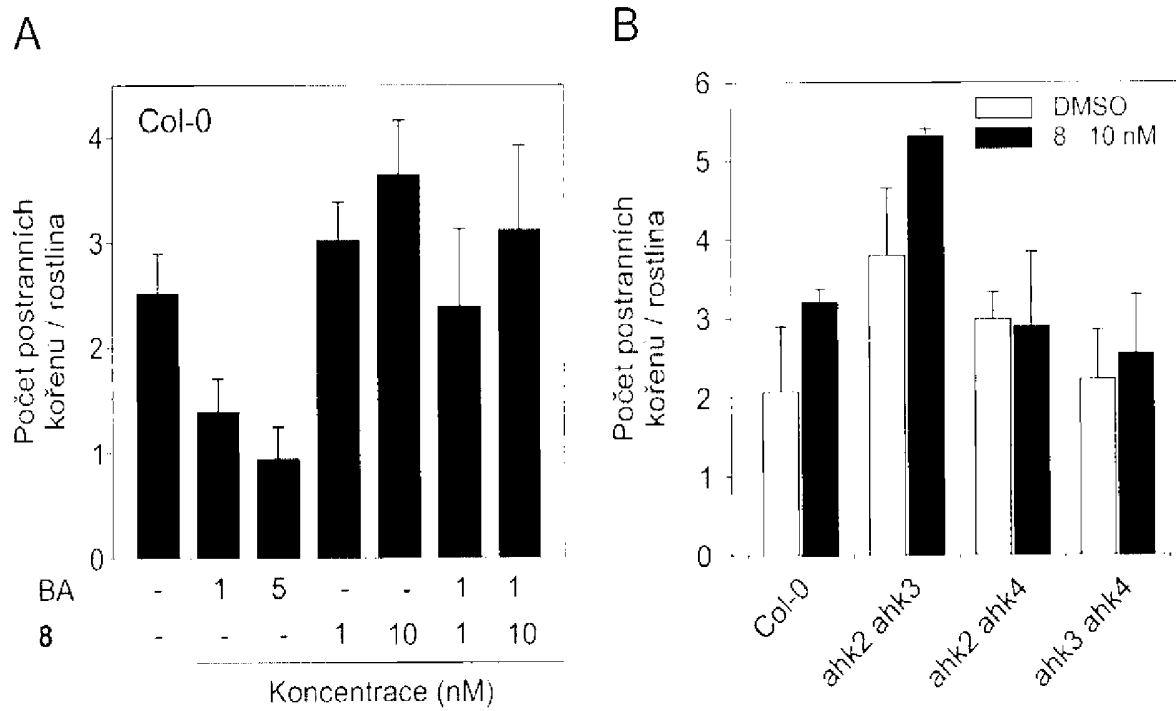
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

