

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 649

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 285/06 (2006.01)
C07D 417/12 (2006.01)
C07D 407/12 (2006.01)
A01N 43/828 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-613**
(22) Přihlášeno: **09.09.2014**
(40) Zveřejněno: **20.01.2016**
(Věstník č. 3/2016)
(47) Uděleno: **09.12.2015**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **20.01.2016**
(Věstník č. 3/2016)

(56) Relevantní dokumenty:
(Pubchem), PubChem CID: 1499050 (2005-07-11), 13729976 (2007-02-08), 72858603 (2014-02-28).
GB 1 195 672 A; US 4 130 414 A; US 4 163 658 A; KR 83-271 A; US 4 402 726 A; WO 02/05638 A.

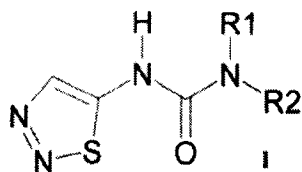
(73) Majitel patentu:
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,
Praha 6- Lysolaje, CZ

(72) Původce:
Mgr. Jaroslav Nisler, Ph.D., Olomouc, CZ
RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D., Šumperk, CZ
Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D., Olomouc, CZ
Mgr. Dr. Karel Doležal, Hlubočky, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc.DSc., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název vynálezu:
**Deriváty 1,2,3-thiadiazol-5-yl močoviny,
jejich použití pro regulaci senescence rostlin
a přípravky obsahující tyto deriváty**

(57) Anotace:
Substituované 1,2,3-thiadiazol-5-yl-deriváty močoviny
obecného vzorce I, jejich použití jako anti-senescenčních
a anti-stresových faktorů na rostlinné buňky, orgány a
celou rostlinu, a přípravky obsahující tyto deriváty.



CZ 305649 B6

Deriváty 1,2,3-thiadiazol-5-yl močoviny; jejich použití pro regulaci senescence rostlin a přípravky obsahující tyto deriváty

5 Oblast techniky

Vynález se týká substituovaných derivátů 1,2,3-thiadiazol-5-yl močoviny, jejich použití jako antistresových látek při regulaci rostlinné a stárnutí rostlinných orgánů a buněk, a přípravků tyto deriváty obsahujících.

10

Dosavadní stav techniky

Stresem indukovaná senescence je dnes hlavním problémem z agro-ekonomického úhlu pohledu a ohrožuje dostupnost potravin na celém světě. Je známo pouze několik látek, které mají anti-senescenční a/nebo antioxidační vlastnosti, a řada z nich zároveň vykazuje nežádoucí vedlejší účinky, jako je inhibice růstu kořene (týká se na purinu založených látek jako je 6-benzylaminopurin (BAP) a zeatin). Z tohoto důvodu je potřeba poskytnout nové skupiny látek se silnými antistresovými vlastnostmi, které nevykazují nežádoucí vedlejší účinky.

20

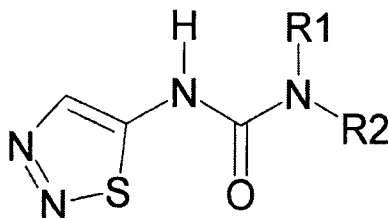
Předmětem tohoto vynálezu je poskytnout nové močovinné deriváty, které mají vyšší selektivitu a index účinnosti v inhibici stárnutí rostlin a příznaků vyvolaných stresem, a to bez nežádoucích inhibičních účinků na vývoj kořene.

25

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu jsou 1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinné deriváty obecného vzorce I

30



(I),

kde

R2 je vodík;

35

R1 je vybrán ze skupiny zahrnující

C₁-C₆ alkyl, substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

40

C₂-C₆ alkenyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

C₂-C₆ alkynyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

45

tetrahydrofuran-2-yl-methyl nebo tetrahydrofuran-3-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

thiofen-2-yl-methyl nebo thiofen-3-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

5 furan-2-yl-methyl nebo furan-3-yl-methyl substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

1,3-dioxolan-2-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

10 tetrahydropyran-2-yl-methyl, tetrahydropyran-3-yl-methyl nebo tetrahydrofuran-4-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

15 (3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)methyl, (3,4-dihydro-2H-pyran-3-yl)methyl, (3,4-dihydro-2H-pyran-4-yl)methyl, (3,4-dihydro-2H-pyran-5-yl)methyl nebo (3,4-dihydro-2H-pyran-6-yl)methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen.

Předmětem předloženého vynálezu je použití 1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinových derivátů obecného vzorce I jako antistresových látek a látek pro inhibici senescence rostlin, rostlinných orgánů a rostlinných buněk.

20 S výhodou, je-li R₁ alkyl, alkenyl nebo alkynyl, tyto skupiny jsou substituovány na terminálním atomu alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen.

25 Generické názvy substituentů mají významy, jak je definováno níže:

alkyl znamená rozvětvenou nebo lineární alkylovou skupinu;

alkenyl znamená rozvětvený nebo lineární uhlovodíkový řetězec s alespoň jednou dvojnou vazbou;

30 alkynyl znamená rozvětvený nebo lineární uhlovodíkový řetězec s alespoň jednou trojnou vazbou;

halogen je vybrán ze skupiny zahrnující fluor, chlor, brom a jod;

kyano označuje skupinu -CN;

hydroxy označuje skupinu -OH;

alkyloxy označuje skupinu -O-alkyl, s výhodou alkyloxy je methyloxy nebo ethyloxy;

35 thio označuje skupinu -SH;

alkylthio skupina označuje -S-alkyl, s výhodou alkylthio je methylthio nebo ethylthio.

40 Pokud sloučeniny podle tohoto vynálezu obsahují chirální centrum, pak všechny enantiomery, směsi enantiomerů a racemátů spadají do rámce tohoto vynálezu. Předkládaný vynález dále zahrnuje sloučeniny obecného vzorce I, pokud jsou ve formě solí s alkalickými kovy a kovy alkalických zemin, amonné soli nebo aminy, jakož i ve formě adičních solí s kyselinami.

5 S výhodou jsou R₁ vybrány z: 2-hydroxy-ethyl, 3-hydroxy-propyl, 4-hydroxy-butyl, 5-hydroxy-pentyl, 6-hydroxy-hexyl, 2-methoxy-ethyl, 3-methoxy-propyl, 4-methoxy-butyl, 5-methoxy-pentyl, 6-methoxy-hexyl, 2-ethoxy-ethyl, 3-ethoxy-propyl, 4-ethoxy-butyl, 5-ethoxy-pentyl, 6-ethoxy-hexyl, 2,2-dimethoxy-ethyl, 1,2-dimethoxy-ethyl, 1,2,2-trimethoxy-ethyl, 3,3-dimethoxy-propyl, (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl, (Z)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl, 3-methyl-but-2-enyl, isopentenyl, 2-hydroxy-propyl, 2-hydroxy-1-methyl-ethyl, 2-methoxy-propyl, 2-methoxy-1-methyl-ethyl, 3,3-dimethoxy-1-methyl-propyl, 3,3-dimethoxy-2-methyl-propyl, 2,3,3-trimethoxy-propyl, 4,4-dimethoxy-butyl, 3,4,4-trimethoxy-butyl, 2-thio-ethyl, 3-thio-propyl, 4-thio-butyl, 5-thio-pentyl, 6-thio-hexyl, 2-methylthio-ethyl, 3-methylthio-propyl, 4-methylthio-butyl, 5-methylthio-pentyl, 6-methylthio-hexyl, 2-

ethylthio-ethyl, 3-ethylthio-propyl, 4-ethylthio-butyl, 5-ethylthio-pentyl, 6-ethylthio-hexyl, vinyl, allyl, but-3-enyl, pent-4-enyl, hex-5-enyl, ethynyl, prop-2-ynyl, but-3-ynyl, pent-4-ynyl, hex-5-ynyl, (Z)-buta-1,3-dienyl, (1Z,3E)-penta-1,3-dienyl, (E)-penta-2,4-dienyl, (1Z,3E)-hexa-1,3,5-trienyl, (2E,4E)-hexa-2,4-dienyl, (E)-hexa-3,5-dienyl, 2-chlor-ethyl, 3-chlor-propyl, 4-chlor-butyl, 5-chlor-pentyl, 6-chlor-hexyl, 2-brom-ethyl, 3-brom-propyl, 4-brom-butyl, 5-brom-pentyl, 6-brom-hexyl, tetrahydrofuran-2-yl-methyl, tetrahydrofuran-3-yl-methyl, thiofen-2-yl-methyl, (5-methyl-furan-2-yl)-methyl, 1,3-dioxolan-2-yl-methyl, tetrahydropyran-2-yl-methyl, 3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl-methyl, 4-hydroxy-3-methylbutyl, (Z)-1'-metyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl, (E)-1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl.

V dalším výhodném provedení je sloučenina obecného vzorce I vybrána z: 1-(2-hydroxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-hydroxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-hydroxy-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-hydroxy-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-methoxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-methoxy-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-methoxy-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-ethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-ethoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-ethoxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-ethoxy-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-ethoxy-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(1,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-3-(1,2,2-trimethoxy-ethyl)-urea, 1-(3,3-dimethoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3,3-dimethoxy-1-methyl-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3,3-dimethoxy-2-methyl-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-3-(2,3,3-trimethoxy-propyl)-urea, 1-(4,4-Dimethoxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-[1,2,3]Thiadiazol-5-yl-3-(3,4,4-trimethoxy-butyl)-urea, 1-(2-thio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-thio-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-thio-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-thio-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-thio-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methylthio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-methylthio-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-methylthio-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-methylthio-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-methylthio-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-ethylthio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-ethylthio-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-ethylthio-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-ethylthio-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-ethylthio-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-vinyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-urea, 1-allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-but-3-enyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-pent-4-enyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-hex-5-enyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-ethynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-prop-2-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-but-3-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-pent-4-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-hex-5-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-hydroxy-3-methylbutyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((Z)-buta-1,3-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((1Z,3E)-Penta-1,3-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-penta-2,4-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((1Z,3E)-hexa-1,3,5-trienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((2E,4E)-hexa-2,4-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-hexa-3,5-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-chlor-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-chlor-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-chlor-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-chlor-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-chlor-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-brom-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-brompropyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-4-brom-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-brom-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-brom-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(tetrahydrofuran-3-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(thiofen-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadia-

zol-5-yl-urea, 1-(5-methyl-furan-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(1,3-dioxolan-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(tetrahydropyran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea.

- 5 Sloučeniny podle předkládaného vynálezu nevykazují nežádoucí inhibiční aktivitu na růst kořenů, která je typická pro jiné anti-senescenční sloučeniny podle dosavadního stavu techniky. I při vysokých koncentracích negativní vliv na růst kořenů není přítomen, nebo je tento negativní vliv silně potlačen.
- 10 Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou aplikovat na celé rostliny, rostlinné orgány, nebo na rostlinné buňky, např. v tkáňových kulturách. Jsou vhodné zejména pro použití v tkáňových kulturách, protože nevykazují inhibiční efekt na růst a dělení rostlinných buněk při vysokých koncentracích a vykazují minimální toxicitu pro tyto buňky ve srovnání s jinými anti-senescenčními sloučeninami známými z dosavadního stavu techniky. To umožňuje jejich použití
- 15 v širokém koncentračním rozmezí bez negativních účinků.

Dalším aspektem tohoto vynálezu je použití 1,2,3-thiadiazol-5-yl-derivátů močoviny obecného vzorce I pro oddálení degradace chlorofylu a senescence rostlinných tkání, Tento pozitivní účinek souvisí s jedinečným efektem těchto derivátů na peroxidaci membránových lipidů. 1,2,3-Thiadiazol-5-yl-močovinné deriváty podle předkládaného vynálezu brání peroxidaci membránových lipidů, což dále zvyšuje jejich anti-senescenční a anti-stresovou aktivitu.

20

Dalším aspektem tohoto vynálezu je použití substituovaných 1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinných derivátů obecného vzorce I jako inhibitorů stresu a stresem indukované senescence v produkci plodin, zejména obilovin (pšenice, ječmen, rýže, kukuřice, žito, oves, čirok a příbuzné druhy), řepa (cukrová řepa a krnná řepa); malvice, peckovice a měkké ovoce (jablka, hrušky, švestky, broskve, mandle, třešně, jahody a ostružiny); luštěniny (fazole, čočka, hrách, sójové boby); olejníky (řepka, hořčice, mák, olivy, slunečnice, kokos, ricinus, kakaové boby, podzemnice olejná); okurky (dýně, okurky, melouny); vláknité rostliny (bavlna, len, konopí, juta); citrusové plody (pomaranče, citrony, grapefruity, mandarinky); zelenina (špenát, skořicovník, kafr) nebo rostliny, jako je tabák, ořechy, lilek, cukrová třtina, čaj, vinná réva, chmel, banány a přírodní kaučuk a léčivé rostliny, stejně jako okrasné rostliny. Plevely, které mají být kontrolovány mohou být jak jednoděložné tak dvouděložné, 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*, *Ipomoena*, *Chrysanthemum*, *Galium*, *Viola* a *Veronica*.

25

30

35

Stresem může být zejména stres způsobený suchem a salinitou (salinní stres).

40 Vynález dále zahrnuje anti-senescenční a/nebo anti-stresové přípravky pro rostliny, rostlinné orgány a rostlinné buňky, obsahující alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I a alespoň jednu pomocnou látku.

Vynález se dále týká způsobu inhibice stresu a/nebo senescence v rostlinách, rostlinných orgánech a/nebo v rostlinných buňkách, který zahrnuje aplikaci alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I na rostlinu, rostlinný orgán a/nebo rostlinnou buňku.

45

Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být připraveny odborníku známými chemickými způsoby. S výhodou mohou být připraveny způsobem, ve kterém je 1,2,3-thiadiazol-5-yl-isokyanát připraven konvenční metodou (Kurita K. a Iwakura Y., J. Org. Chem. 41, 2070-71 (1976)) z 1,2,3-thiadiazol-5-ylaminu a difosgenem. 1,2,3-thiadiazol-5-ylisocyanát se pak nechá reagovat s odpovídajícím aminem, čímž se získá požadovaný produkt.

50

Sloučeniny obecného vzorce I se používají v nemodifikované formě nebo výhodně společně s pomocnými látkami běžně používanými pro formulaci přípravků. Za tímto účelem jsou přípravky výhodně formulovány jako koncentráty účinných látek, jakož i suspenze a disperze, s výhodou

55

izotonické vodné roztoky, suspenze a disperze, zředěné emulze, rozpustné prášky, poprašky, granuláty, krémy, gely, olejové suspenze a také 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, solubilizační činidla, stejně jako hnojiva, donory stopových prvků nebo jiných prostředků k dosažení speciálních efektů.

10 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 97/34 485.

Také vhodné pro přípravu kompozic, které obsahují sloučeniny, odvozené od 1,2,3-thiadiazolmočoviny obecného vzorce I podle vynálezu, 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, MunichNienna, 1981 and M. and J. Ash, „Encyclopedia of Surfactants“, Vol-III, 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 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 epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný palmový olej 0:1, řepkový nebo olivový olej), odpěňovače, např. silikonový olej, konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovadla anebo emulgátory, viskozitní činidla, pojiva, lepidla, a také hnojiva a další aktivní přísady. S výhodou jsou používány přípravky následujícího složení: (% = hmotnostní procento).

Emulgované koncentráty:

45	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:

50	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:

55	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:

5 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:

10 aktivní složka: 0,1 až 30 %, s výhodou 0,1 až 15 %
pevný nosič: 99,9 až 70 %, s výhodou 99,9 až 85 %

15 Kompozice mohou rovněž obsahovat další příměsi, jakými jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný kokosový olej, řepkový olej nebo sójový olej), odpeňovače, 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:

20 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.

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

30 c) Obalování osiva cestou máčení semen po dobu 1 až 72 h v tekutině obsahující od 100 do 1000 ppm (0,01 až 0,1 %) sloučeniny obecného vzorce I nebo její soli, a s výhodou následného usušení semen (imerzní obalování).

35 Obecně jsou látky vzorce I 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

40 Kapalná formulace je aplikována v množství od 0,005 do 5,0 kg na hektar. Taková cisternová aplikace se provádí před anebo po setí.

iii) Aplikace do semenné brázdy

45 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 pre-emergentním procesu.

50 iv) Kontrolované uvolňování aktivních látek

55 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 určitou specifickou periodu (obalované granule).

Objasnění výkresů

Obr. 1. Účinek sloučeniny 6 na vývoj rostlin pšenice, které byly vystaveny salinnímu stresu. Levé obrázky představují rostliny, které byly ošetřeny jednou 100 mM vodným roztokem sloučeniny 6 na počátku experimentu. Pravé obrázky představují kontrolní rostliny, které byly zality pouze vodou. Sedm dní po výsadbě rostliny byly ošetřeny 75 mM roztokem NaCl. Byly pořízeny fotografie 25 (A, B) a 30 (C) dní po výsadbě.

10 Příklady uskutečnění vynálezu

Výchozím materiálem pro sloučeniny obecného vzorce I je 1,2,3-thiadiazol-5-yl-amin, který byl získán t TCI Europe. 1,2,3-Thiadiazol-5-ylamin se převede na 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazol mícháním 1,2,3-thiadiazol-5-yl-aminu s nadbytečným množstvím difosgenu v THF. Sloučeniny obecného vzorce I mohou být potom připraveny mírným zahříváním 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazolu a odpovídajícího aminu (komerčně dostupné od Sigma Aldrich, Olchemim, TCI Europe) v přítomnosti katalytického množství triethylaminu v THF. Aminy sloučenin obsahujících hydroxylovou skupinu, byly chráněny tert-butyl dimethylsilylovou skupinou před kondenzací s 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazolem; odstranění chránicí skupiny se provádí v propanolické HCl, vše podle Greene TW a Wuts PGM; Protective Groups in Organic Synthesis 3rd ed., New York, (1991).

Elementární analýzy (C, H a N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Fissons Instruments). Teplotě tání byl stanoven na přístroji BÜCHI Melting Point B-540 a je neupraven. 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 až 1500 u. Spektra byla měřena za použití cyklických skenů o délce 3,0 sekundy, při napětí na vstupní šterbině 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 Jeol 500 SS při teplotě 300 K a frekvenci 500,13 MHz (¹H). Vzorokly byly připraveny rozpuštěním daných látek v DMSO-*d*₆. Tetramethylsilan (TMS) byl použit jako inertní standard.

35

Příklad 1

Příprava 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazolu

Syntéza izokyanátů z aminů byla popsána již dříve (Kurita K. a Iwakura Y., J. Org. Chem. 41, 2070–71 (1976)). Detailně, 1,2,3-thiadiazol-5-yl amin (1,01 g, 10 mmol) byl rozpuštěn v THF (40 mL) a přidáván po kapkách do roztoku difosgenu (2,6 g, 13 mmol) v THF (100 mL). Reakční směs byla míchána po dobu 40 minut při teplotě -10 °C; pak se reakční směs krátce zahřeje na teplotu 30 °C. Po zahřátí, se rozpouštědlo a přebytek difosgenu odpaří. Žlutý pevný zbytek byl 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazol, který se znovu re-suspenduje v diethyléteru a odfiltruje se. Výtěžek: 95%, ¹H NMR (δ, ppm, DMSO-*d*₆): 7,75 (1H, s, CH).

50

Příklad 2

Příprava 1-(2-Hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-močoviny (25)

1-Amino-propan-2-ol (0,097 g, 1,3 mmol) se smísí s THF (10 mL) a triethylamin (0,262 g; 2,6 mol) a pak tert-butyl dimethylsilyl chlorid (0,286 g, 1,9 mmol) byl přidán. Směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Pak tert-butyl dimethylsilyl chlorid byl odfiltrován a

matečné louhy byly odpařeny. 2-Trimethylsilanyloxy-propylamin (0,13 g) se použije bez další analýzy. 5-isokyanato-1,2,3-thiadiazol (111,8 mg, 0,88 mmol) se smísí s 2-trimethylsilanyloxy-propylaminem (130 mg, 0,88 mmol) v THF (10 mL) a katalytickým množstvím triethylaminu. Reakční směs byla míchána při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin ve vysokotlaké tubě. TLC (CHCl₃:MeOH, 4:1) ukázala úplnou konverzi výchozích sloučenin na O-chráněnou močovinu. Rozpouštědlo bylo nahrazeno 5 mL 2-propanolu a odstranění chránicí skupiny bylo provedeno 5–6 M kyselinou chlorovodíkovou v 2-propanolu (3 mL). Směs byla míchána 17 hodin. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se suspenduje ve vodě (10 mL). Produkt byl extrahován pomocí ethylacetátu (4x 4 mL). Ethylacetát byl nahrazen diethyletherem a bílé krystaly odfiltrovány. Výtěžek: 63 mg bílé látky (35,2 %). TLC (chloroform-methanol, 4:1): jeden jediný spot; bez výchozího materiálu, HPLC čistota: 98 +%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 2,95 – 3,01 (1H, m, CH₂), 3,10 – 3,16 (1H, m, CH₂), 1,00 (3H, d, J = 6,11, CH₃), 3,66 (1H, heptet, J = 6,72, CH), 4,78 (1H, d, J = 4,28, OH), 6,91 (1H, s(br), NH), 8,46 (1H, s, CH), 10,64 (1H, s, NH).

15

Příklad 3

Příprava 1-(2-chlor-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-močoviny (65)

5-Isokyanato-1,2,3-thiadiazol (0,127 g, 0,001 mol) se smísí s 2-chlor-ethylaminem hydrochloridem (0,116 g; 0,001 mol) v dichlormethanu (DCM, 10 mL) a triethylaminem (0,151 g, 0,0015). Reakční směs byla míchána při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti byl triethylamonium chlorid odstraněn z reakční směsi extrakcí vodou (3x 2 mL). DCM vrstva se suší nad MgSO₄ a rozpouštědlo odpařeno. Zbytek byl resuspendován v diethyletheru a žlutá sraženina odfiltrována. Výtěžek: 0,13 g bílé látky (63,1%). TLC (chloroform-methanol, 9:1): jeden jediný spot; bez výchozího materiálu, HPLC čistota: 98 +%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 3,45 (2H, q, J = 6,30, CH₂), 3,65 (2H, q, J = 6,30, CH₂), 7,24 (1H, t, J = 6,30, NH), 8,47 (1H, s, CH), 10,87 (1H, s, NH).

30

Příklad 4

Příprava 1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-močovina (16)

5-Isokyanato-1,2,3-thiadiazol (0,127 g, 0,001 mol) se smísí s 2,2-diethylaminem (0,105 g, 0,001 mol) v THF (6 mL) a katalytickým množstvím triethylaminu. Reakční směs byla míchána při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti se rozpouštědlo odpaří a zbytek se rozpustí v DCM a sráží se diethyletherem. Bílá sraženina se odfiltruje. Výtěžek: 0,151 g bílé látky (65,1%). TLC (chloroform-methanol, 9:1): jeden jediný spot; bez výchozího materiálu, HPLC čistota: 98 +%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 3,36 – 3,39 (8H, m, CH₂, 2xCH₃), 4,38 (1H, t, J = 5,0, CH), 6,21 (1H, t, J = 5,5, NH), 8,28 (1H, s, CH), 10,30 (1H, s(br), NH).

45

Příklad 5

Příprava 1-Allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-močoviny (50)

5-Isokyanato-1,2,3-thiadiazol (127 mg, 1 mmol) se smísí s allylaminem (57,1 mg; 1 mmol) v THF (6 mL) a katalytickým množstvím triethylaminu. Reakční směs byla míchána při teplotě 60 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti se rozpouštědlo odpaří a zbytek se čistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze CHCl₃: MeOH, 9:1). Výtěžek: 120 mg bílé látky (66,6 %). TLC (chloroform-methanol, 9:1): jeden jediný spot; bez výchozího materiálu, HPLC čistota: 98 +%. ¹H NMR (CDCl₃-*d*₁): 3,75 (2H, d, J = 5,15, CH₂), 4,97 (1H, d, J = 10,31, CH₂), 5,04 (1H, d, J = 17,18, CH₂), 5,68 (1H, octet, J₁ = 5,15, J₂ = 6,87, CH), 6,13 (1H, s(br), NH), 8,19 (1H, s(br), CH), 10,14 (1H, s(br), NH).

55

Příklad 6

Příprava 1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-močoviny (6)

- 5 5-Isokyanato-1,2,3-thiadiazol (v množství 12,7 g, 0,1 mol) byl smíchán s 2-methoxyethyl-aminem (7,51 g, 0,1 mol) v THF (600 mL) a katalytickém množství triethylaminu (600 u1). Re-
 10 akční směs byla míchána při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti se rozpouštědlo odpaří na pevný zbytek, a produkt se krystaluje z ethanolu. Sraženina se odfiltruje, promyje étherem (2x 100 mL) a suší se v sušárně při teplotě 60 °C do konstantní hmotnosti. Vý-
 těžek: 13,0 g bílé látky (64,3 %). TLC (chloroform-methanol, 9:1), jeden jediný spot; bez výcho-
 zího materiálu, HPLC čistota: 98 +%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 3,22 (3H, s, CH₃), 3,28 (2H, t, J = 5,73, CH₂), 3,36 (2H, t, J = 5,15, CH₂), 7,03 (1H, t, J = 5,73, NH), 8,45 (1H, s, CH), 10,67 (1H, s, NH).

Tabulka 1

15

Sloučeniny připravené způsobem podle příkladů 2-6

No	R1	R2	Elementární analýza vypočteno/nalezeno			ES MS [M+H] ⁺
			%C	%H	%N	
1	2-hydroxy-ethyl	H	31,9/32,2	4,3/4,4	30,0/30,3	189,3
2	3-hydroxy-propyl	H	35,6/35,3	5,0/4,8	27,7/27,5	203,1
3	4-hydroxy-butyl	H	38,9/38,4	5,6/5,7	25,9/26,2	217,1
4	5-hydroxy-pentyl	H	41,7/42,0	6,1/6,3	24,3/24,5	231,3
5	6-hydroxy-hexyl	H	44,3/44,5	6,6/6,8	23,0/22,8	245,1
6	2-methoxy-ethyl	H	35,6/35,8	5,0/5,2	27,7/28,0	203,2
7	3-methoxy-propyl	H	38,9/38,6	5,6/5,4	25,9/25,7	217,2
8	4-methoxy-butyl	H	41,7/42,0	6,1/6,0	24,3/24,4	231,2
9	5-methoxy-pentyl	H	44,3/44,1	6,6/6,6	23,0/23,3	245,1
10	6-methoxy-hexyl	H	46,5/46,8	7,0/7,1	21,7/21,8	259,2
11	2-ethoxy-ethyl	H	38,9/39,2	5,6/5,4	25,9/26,0	217,2
12	3-ethoxy-propyl	H	41,7/41,8	6,1/6,1	24,3/24,5	231,2
13	4-ethoxy-butyl	H	44,3/44,5	6,6/6,5	23,0/23,2	245,1
14	5-ethoxy-pentyl	H	46,5/46,2	7,0/7,2	21,7/21,5	259,2
15	6-ethoxy-hexyl	H	48,5/48,4	7,4/7,3	20,6/20,7	273,4
16	2,2-dimethoxy-ethyl	H	36,2/36,5	5,2/5,3	24,1/23,8	233,3
17	1,2-dimethoxy-ethyl	H	36,2/36,6	5,2/5,4	24,1/23,9	233,3
18	1,2,2-trimethoxy-ethyl	H	36,6/36,4	5,4/5,3	21,4/21,6	263,3
19	3,3-dimethoxy-propyl	H	39,0/39,3	5,7/5,6	22,8/22,7	246,3
20	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl	H	42,1/42,0	5,3/5,5	24,5/24,8	229,3
21	3-methyl-but-2-enyl	H	45,3/45,1	5,7/5,8	26,4/26,5	213,3
22	isopentenyl	H	45,3/45,0	5,7/5,7	26,4/26,8	213,3
23	4-hydroxy-3-methylbutyl	H	41,7/41,8	6,1/6,0	24,3/24,0	231,4
24	(E)-1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl	H	44,6/44,8	5,8/5,9	23,1/22,7	243,4
25	2-hydroxy-propyl	H	35,6/35,9	5,0/4,8	27,7/27,4	203,1
26	2-hydroxy-1-methyl-ethyl	H	35,6/35,8	5,0/5,1	27,7/7,5	203,2
27	2-methoxy-propyl	H	38,9/38,7	5,6/5,6	25,9/26,2	217,2
28	2-methoxy-1-methyl-ethyl	H	38,9/38,5	5,6/5,8	25,9/25,7	217,3

29	3,3-dimethoxy-1-methyl-propyl	H	41,5/41,8	6,2/6,1	21,5/21,1	261,4
30	3,3-dimethoxy-2-methyl-propyl	H	41,5/41,7	6,2/6,3	21,5/21,2	261,4
31	2,3,3-trimethoxy-propyl	H	39,1/39,4	5,8/5,9	20,3/20,5	277,2
32	4,4-dimethoxy-butyl	H	41,5/41	6,2/6,1	21,5/21,8	261,4
33	3,4,4-trimethoxy-butyl	H	41,4/8	6,3/6,3	19,3/19,0	290,4
34	2-thio-ethyl	H	29,4/29,5	4,0/4,1	27,4/27,8	205,3
35	3-thio-propyl	H	33,0/33,2	4,6/4,5	25,7/25,5	218,4
36	4-thio-butyl	H	36,2/36,1	5,2/5,3	24,1/24,3	233,4
37	5-thio-pentyl	H	39,0/39,0	5,7/5,5	22,7/28,0	247,4
38	6-thio-hexyl	H	41,5/41,6	6,2/6,0	21,5/21,5	261,2
39	2-methylthio-ethyl	H	33,0/33,2	4,6/4,5	25,7/25,8	218,2
40	3-methylthio-propyl	H	36,2/36,0	5,2/5,4	24,1/23,8	233,3
41	4-methylthio-butyl	H	39,0/39,1	5,7/5,6	22,7/22,8	247,4
42	5-methylthio-pentyl	H	41,5/41,5	6,2/6,3	21,5/21,2	261,3
43	6-methylthio-hexyl	H	43,8/43,5	6,6/6,5	20,4/20,4	275,4
44	2-ethylthio-ethyl	H	36,2/36,5	5,2/5,3	24,1/24,4	233,4
45	3-ethylthio-propyl	H	39,0/38,6	5,7/5,6	22,7/22,9	247,4
46	4-ethylthio-butyl	H	41,5/41,3	6,2/6,3	21,5/21,7	261,2
47	5-ethylthio-pentyl	H	43,8/43,7	6,6/6,5	20,4/20,3	275,3
48	6-ethylthio-hexyl	H	45,8/45,7	7,0/6,8	19,4/19,5	289,3
49	vinyl	H	35,3/35,5	3,5/3,4	33,0/33,0	171,3
50	allyl	H	39,1/39,4	4,4/4,5	30,4/30,2	185,3
51	but-3-enyl	H	42,4/42,6	5,1/5,2	28,3/28,6	199,1
52	Pent-4-enyl	H	45,3/45,3	5,7/5,8	26,4/26,7	213,4
53	Hex-5-enyl	H	47,8/47,7	6,2/6,0	24,8/25,0	227,4
54	Ethynyl	H	35,7/35,8	2,4/2,4	33,3/33,2	169,2
55	Prop-2-ynyl	H	39,5/39,8	3,3/3,4	30,8/30,9	183,3
56	But-3-ynyl	H	42,9/42,7	4,2/4,1	28,6/28,4	197,3
57	Pent-4-ynyl	H	45,7/45,6	4,8/4,6	26,7/26,6	211,3
58	Hex-5-ynyl	H	48,2/48,2	5,4/5,5	25,0/25,2	225,2
59	(Z)-Buta-1,3-dienyl	H	42,9/42,7	4,1/4,2	28,6/28,3	197,4
60	(1Z,3E)-Penta-1,3-dienyl	H	45,7/46,0	4,8/4,9	26,7/26,4	211,4
61	(E)-Penta-2,4-dienyl	H	45,7/45,9	4,8/5,0	26,7/26,4	211,4
62	(1Z,3E)-Hexa-1,3,5-trienyl	H	48,6/48,5	4,5/4,5	25,2/25,0	223,3
63	(2E,4E)-Hexa-2,4-dienyl	H	48,2/48,0	5,4/5,5	25,0/24,7	225,4
64	(E)-Hexa-3,5-dienyl	H	48,2/48,4	5,4/5,6	25,0/25,1	225,4
65	2-chlor - ethyl	H	29,1/29,3	3,4/3,5	27,1/27,4	207,6
66	3-chlor - propyl	H	32,7/32,5	4,1/4,0	25,4/25,5	221,8
67	4-chlor - butyl	H	35,8/35,7	4,7/4,8	23,9/24,2	235,6
68	5-chlor - pentyl	H	38,6/39,8	5,3/5,4	22,5/22,1	249,8
69	6-chlor - hexyl	H	41,1/39,8	5,8/5,6	21,3/21,2	263,8
70	2-brom - ethyl	H	23,9/24,1	2,8/2,9	22,3/22,6	252,2
71	3-brom - propyl	H	27,2/27,5	3,4/3,5	21,1/21,0	266,2
72	4-brom - butyl	H	30,1/30,5	4,0/3,9	20,1/20,4	280,2
73	5-brom - pentyl	H	32,8/33,1	4,5/4,4	27,3/27,0	294,3

74	6-bromø-hexyl	H	35,2/35,1	4,9/4,9	18,2/18,6	308,1
75	tetrahydrofuran-2-yl-methyl	H	42,1/42,0	5,3/5,4	24,5/24,3	229,1
76	tetrahydrofuran-3-yl-methyl	H	42,1/42,0	5,3/5,4	24,5/24,3	229,1
78	thiophen-2-yl-methyl	H	40,0/40,3	3,3/3,3	23,3/23,5	241,2
79	(5-methyl-furan-2-yl)-methyl	H	45,4/45,6	4,2/4,4	23,5/23,4	239,3
80	1,3-dioxolan-2-yl-methyl	H	36,5/36,7	4,4/4,2	24,3/24,1	231,1
81	tetrahydropyran-2-yl-methyl	H	44,6/44,7	5,8/6,0	23,1/23,0	243,2
82	3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl-methyl	H	45,0/44,8	5,0/4,8	23,3/23,6	241,2
91	(Z)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl	H	42,1/42,3	5,3/5,4	24,5/24,5	229,2

Příklad 7

5

Anti-senescenční aktivita nových sloučenin testovaných v senescenčním testu na listových segmentech pšenice kultivovaných ve tmě

10 Semena ozimé pšenice *Triticum aestivum* cv. Hereward byla promyta pod tekoucí vodou po 24 h 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 mmol.m⁻².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

15 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

20 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 2krát. V každém experimentu byla otestována aktivita nových sloučenin a porovnána s aktivitou N9-nesubstituovaného rodičovského cytokininu, 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. Hodnoty IC₅₀ byly stanoveny pro

25 standard (BAP) a pro nové sloučeniny.

30

Všechny testované sloučeniny obecného vzorce I vykazují pozitivní vliv na oddálení senescence v segmentech listů pšenice ve tmě. Všechny nově připravené a testované 1,2,3-thiadiazol-5-yl deriváty močoviny obecného vzorce I překročily anti-senescenční aktivitu BAPu. Důležité je, že většina testovaných 1,2,3-thiadiazol-5-yl derivátů močoviny obecného vzorce I překročila anti-senescenční aktivitu BAPu alespoň o jeden nebo dva řády.

35

Tabulka 2

Vliv nových sloučenin na oddálení senescence v dekapitovaných segmentech listů *Triticum aestivum* cv. Hereward ve tmě.

5

No	Látka	Senescenční biotest	
		(IC ₅₀ , μM)/s.d.	
	6-benzylaminopurine (BAP)	155	(±22)
1	1-(2-hydroxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	26	(±4,5)
2	1-(3-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	9,1	(±2,7)
6	1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,95	(±0,24)
7	1-(3-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	11,4	(±3,8)
8	1-(4-methoxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	25,5	(±5,2)
9	1-(5-methoxy-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	31	(±5)
10	1-(6-methoxy-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	45	(±11)
16	1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	2,9	(±1,3)
20	1-((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	12,6	(±4,0)
21	1-(3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	97	(±15)
25	1-(2-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	3,5	(±0,6)
28	1-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	8,6	(±3,5)
34	1-(2-thio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	18	(±4,3)
35	1-(3-thio-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	12	(±2,9)
39	1-(2-methylthio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	3,1	(±1,1)
42	1-(5-methylthio-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	10,5	(±0,9)
50	1-allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	7,1	(±2,1)
55	1-(prop-2-ynyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	22	(±8,2)
65	1-(2-chlor-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	14	(±0,8)
75	1-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	11,2	(±4,2)
78	1-(thiophen-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	32	(±8)
79	1-((5-methyl-furan-2-yl)-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	45	(±8,5)

10 Příklad 8

Anti-senescenční aktivita nových sloučenin testovaných v senescenčním testu na listových segmentech pšenice při působení světla

- 15 Schopnost nových sloučenin zpomalit degradaci chlorofylu v listech pšenice byla testována také ve světelných podmínkách. Experiment byl proveden, jak je popsáno v příkladu 7 s modifikací takto – inkubace listů se sloučeninami byla provedena při periodě osvětlení 8/16 (tma/světlo – μmol.m⁻².s⁻¹) při 22 °C po dobu 7 dnů. Jak je ukázáno v tabulce 3, všechny vybrané nové sloučeniny ukázaly silnější pozitivní účinky na oddálení senescence v segmentech listů pšenice ve světelných podmínkách ve srovnání s BAP. Nově připravené substituované 1,2,3-thiadiazol-5-yl-deriváty močoviny obecného vzorce I jsou mnohem silnější anti-senescenční sloučeniny, ve srovnání s BAP ve zpomalení senescence v optimálních světelných podmínkách.
- 20

Tabulka 3

Vliv nových sloučenin na oddálení senescence v dekapitovaných segmentech listů *Triticum aestivum* cv. Hereward na světle.

5

No.	Látka	Senescenční biotest	
		(IC ₅₀ , μM)/s.d.	
	6-benzylaminopurin (BAP)	12,5	(±3,3)
2	1-(3-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,31	(±0,1)
6	1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,03	(±0,02)
7	1-(3-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,4	(±0,08)
16	1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,16	(±0,04)
20	1-((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,61	(±0,22)
25	1-(2-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,10	(±0,02)
28	1-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,43	(±0,03)
50	1-allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,25	(±0,08)
55	1-prop-2-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	1,3	(±0,62)
65	1-(2-chlor - ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,7	(±0,28)
75	1-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	0,42	(±0,22)

10 Příklad 9

Ochrana před peroxidací membránových lipidů v pšenici

Typickým projevem provázejícím senescencí je zvýšení hladiny reaktivních kyslíkových derivátů a následná peroxidace membránových lipidů. Proto byly stanoveny hladiny malonyldialdehydu (MDA), oxidativního markeru poškození membránových lipidů, v oddělených listech pšenice vystavených působení připravených derivátů nebo BAPu po dobu čtyř dnů v temnu, jak bylo popsáno v příkladu 7. Hladiny MDA byly stanoveny pomocí kyseliny thiobarbiturové (TBA). 100 mg čerstvého rostlinného materiálu bylo homogenizováno pomocí oscilačního mlýna (MM301, Retsch, Germany), s 1 mL 80% methanolu. Surový extrakt byl centrifugován při 10,000xg po dobu 5 minut, 100 μL alikvot supernatantu byl protřepán se 100 μL 0,5% (w/v) TBA obsahujícími 0,1% (w/v) trichloroctovou kyselinu, a výsledný roztok byl inkubován 30 minut při 95 °C. Vzorky byly rychle ochlazeny na ledu a centrifugovány 5 minut při 1000xg. Absorbance supernatantu byla změřena při 532 nm s korekcí při 600 nm a množství vzniklého komplexu MDA-TBA bylo vypočítáno z extinkčního koeficientu 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

Nové vybrané deriváty výrazně snižují peroxidaci membránových lipidů ve srovnání s neošetřenou kontrolou a vzorky ošetřené BAP (Tabulka 5 – hodnoty vyjadřují obsah MDA, což je produkt rozkladu membránových lipidů). Nejúčinnější sloučeniny 6 a 74 snižuje úroveň membránové lipidové peroxidace ve stárnocích oddělených listech pšenice na 44,6% a 50,2%. Je zajímavé, že ačkoli BAP výrazně zpožďuje senescenci v samostatných listech pšenice ve tmě, nesnižuje peroxidaci membránových lipidů významně ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Nicméně tato skutečnost by mohla vysvětlit, proč je BAP méně účinný než nové sloučeniny obecného vzorce I v pšeničném senescenčním testu.

35

Nově připravené deriváty obecného vzorce I mají ochrannou funkci před negativním působením reaktivních forem kyslíku, které se hromadí v tkáních během senescence listu.

Tabulka 4

Efekt nových látek na peroxidaci membránových lipidů v průběhu senescence extirpovaných listů *Triticum aestivum* cv. Hereward v temnu.

5

No	Testovaná látka	MDA (nmol/g FW)
	Neošetřená kontrola	21,5 (±2,8)
	6-benzylaminopurin (BAP)	19,1 (±1,7)
2	1-(3-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	16,4 (±1,6)
6	1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	9,6 (±0,7)
7	1-(3-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	14,4 (±0,8)
16	1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	11,6 (±1,2)
20	1-((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	15,8(±0,7)
25	1-(2-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	12,6 (±0,83)
28	1-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	13,9 (±0,9)
50	1-allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	17,4 (±1,3)
55	1-prop-2-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	14,1 (±1,1)
65	1-(2-chlor - ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	16,4 (±0,5)
75	1-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	15,2 (±0,7)

Příklad 10

10

1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-močovina (sloučenina 6) oddaluje senescenci rostlin pšenice stresovaných salinním stresem

15

Zasolení je jedním z hlavních problémů, které negativní ovlivňují úrodnost půdy a omezuje růst a produkci rostlin (Richards, L. A. (Ed.) 1954. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. USDA Agriculture Handbook 60, Washington D. C.). Při salinním stresu, může nastat fyziologické sucho, přebytek soli rostlinám narušuje buněčné funkce a poškozuje fyziologické procesy, jako jsou fotosyntéza a dýchání (Leopold A. C. and Willing R. P., 1984. Evidence for toxicity effects of salts on membranes. In: Staples, R. C., Toenniessen G. H. (Eds.), *Salinity Tolerance in Plants*. John Wiley and Sons, New York: 67–76, Marschner H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London), které společně vedou ke stresem-vyvolané senescenci rostlinných orgánů, a může mít za následek smrt rostlin.

20

25

Pro zkoumání účinku sloučeniny 6 na solí-vyvolanou senescenci, semena ozimé pšenice, *Triticum aestivum* cv. Hereward, byly promyty pod tekoucí vodou po dobu 24 hodin a pak vysety do 1 L nádoby na perlit nasáklý vodou, nebo 100 nM vodným roztokem sloučeniny 6. Nádoby byly umístěny v růstové komoře při 25 °C s 16/8 h světlo/tma při intenzitě 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sedm dní po výsadbě byly rostliny ošetřeny 75 mM roztokem NaCl. Rostliny se nechaly růst a po 25 a 30 dnech od výsadby byly pořízeny jejich fotografie.

30

Na obrázku 1 se ukazuje, že použití sloučeniny 6 může zpomalit senescenci pšeničných rostlin, které jsou pěstovány v solných stresových podmínkách. Obrázek 1A ukazuje celkový pohled na mladé rostliny pšenice 25 dní po výsadbě (pravý kontejner) a bez (levý kontejner) použití sloučeniny 6. Zatímco rostliny na obrázku vlevo mají první list mrtvý a druhý list je žloutnoucí, rostliny

na obrázku vpravo mají první list žlutnoucí a druhý list zelený. Viz detail v obraze 1B. Obrázek 1C ukazuje detail rozvoje stárnutí na rostlinách 30 dní po výsadbě. Fotografie jasně ukazují, že sloučenina 6 významně oddaluje stresem indukovanou senescenci pšeničných rostlin. Tento *in vivo* experiment je důkazem toho, že sloučenina 6 prodlužuje fotosyntetickou životnost rostlin pšenice, které byly vystaveny stresu životního prostředí.

Příklad 11

1,2,3-thiadiazol-5-yl-deriváty močoviny neinhibují růst primárních kořenů ani tvorbu postranních kořenů u *Arabidopsis thaliana*

Anti-senescenční látky jsou známy jako negativní regulátory prodlužování kořenů a tvorby laterálních kořenů (Werner, T., et al., *Proc. Natl Acad Sci USA* 98, 10487–92, 2001) a jejich exogenní aplikace v koncentraci vyšší než 1 μM často způsobují úplnou inhibici růstu kořene. Abychom prozkoumali *in vivo* účinek nových derivátů na růst a vývoj kořene, semena *Arabidopsis thaliana* (wild-type Col-0) byla sterilizována a zaseta na vertikální desky na 1/2 Murashige-Skoog médium (obohacené o 0,1% sacharózu a 6 g/L phytigel) obsahujícím 100 nM BAP nebo 1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinný derivát, nebo 0,01% DMSO (kontrola rozpouštědla). Po vernalizaci (4 dny ve tmě, 4 °C), desky byly převedeny do růstové komory (22 °C, 8/16 světlo/tma). Dva týdny po přenosu, semenáčky byly vyfotografovány a prodloužení kořene a tvorba laterálních kořenů byla hodnocena pomocí Scion image software (Scion Corp., Frederick, MD, USA). Nejméně 40 rostlin bylo měřeno pro každé ošetření.

Zatímco kořeny rostlin, které rostly v přítomnosti BAPu (tabulka 6), byly vážně a významně retardované, kořeny rostlin, které rostly v přítomnosti 1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinných derivátů se vyvinuly normálně (tabulka 6). Délka primárního kořene nebyla významně zkrácena testovanými 1,2,3-thiadiazol-5-yl-močovinnými deriváty ve srovnání s neošetřenou kontrolou, stejně tak jako ani vytvoření postranních kořenů (tabulka 6) nebylo ovlivněno. Oba kořenové parametry byly plus/minus stejné, nebo dokonce vyšší než kořenové parametry kontrolních rostlin. To znamená, že nově připravené substituované deriváty obecného vzorce I nemají negativní vliv na růst a vývoj kořene ve 100 nanomolární koncentraci na rozdíl od vážně inhibičního účinku BAPu a tak mohou být s výhodou použity pro semena, sazenice a ošetření kořene v širším rozsahu koncentrací, než BAP a bez nežádoucích inhibičních účinků.

35

Tabulka 6

Vliv nových sloučenin na délku primárního kořene a počet postranních kořenů *Arabidopsis thaliana*

5

No	Testovaná látka	Délka primárního kořene (mm/s.d.)	Počet laterálních kořenů (±s.d.)
	Neošetřená kontrola	42 (±11)	14 (±8)
	6-benzylaminopurin (BAP)	15 (±5)	3,6 (±2)
2	1-(3-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	39 (±9)	12 (±6)
6	1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	48 (±15)	17 (±9)
7	1-(3-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	40 (±10)	14 (±10)
16	1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	45 (±9)	19 (±9)
20	1-((E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	32(±9)	11(±6)
25	1-(2-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	35 (±0,8)	12 (±8)
28	1-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	41 (±13)	16 (±7)
50	1-Allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	42 (±12)	14 (±10)
55	1-Prop-2-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	40 (±10)	15 (±8)
65	1-(2-chlor - ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	36 (±8)	12 (±8)
75	1-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea	44 (±16)	17 (±6)

Příklad 12

10

Testování ekotoxicity 1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urey (látka 6)

Ekotoxicita byla testována Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, Národní referenční laboratoří (ČIA akreditovaná zkušební laboratoř č. 1071).

15

Použity byly následující metody s následujícími výsledky:

Zkouška	Identifikace metody	Výsledek zkoušky
		[kg/ha]
FC EC20	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31300.1	nedetekován
FC EC50	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31300.1	nedetekován
FC LOEC	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31300.1	nedetekován
FC NOEC	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31300.1	nedetekován
EC EC20	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31290.1	nedetekován
EC EC50	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31290.1	nedetekován
EC LOEC	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31290.1	nedetekován
EC NOEC	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31290.1	nedetekován
SNA EC20	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31220.1	nedetekován
SNA EC50	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31220.1	nedetekován
SNA LOEC	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31220.1	nedetekován
SNA NOEC	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31220.1	>0
OECD-C	JPP ÚKZÚZ, postup č. 31200.1	netoxický
Nejistota uvádí 95% interval spolehlivosti.		

5

Příklad 13

1,2,3-thiadiazol-5-yl-deriváty močoviny nejsou cytotoxické vůči lidským kožním fibroblastům (buněčná linie BJ)

10

Cytotoxicita vybraných připravených sloučenin vůči lidským kožním fibroblastům (buněčná linie BJ) byla stanovena ve standardním Calceinovém AM testu. Buňky byly udržovány v plastických lahvích pro tkáňové kultury a pěstovány v Dublecco modifikovaném Eagle médiu pro buněčné kultury (DMEM) při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂ a 100% vlhkosti. Buňky byly vysety do 96jamkových mikrotitračních destiček (Nunc, Dánsko) a po 12 hodinách preinkubace, byly přidány testované látky, aby konečná koncentrace byla v rozmezí od 0 do 100 μM. Buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin. Na konci inkubační doby byl přidán Calcein AM v PBS v konečné koncentraci 1 μg / ml. Po další 1 hodině inkubace byla měřena fluorescence při 485/538 nm (ex/em) pomocí Fluoroskan Ascent (Labsystems, Finsko). Hodnoty IC₅₀, (tj. koncentrace způsobující snížení konverze kalceinu AM na 50%) byly spočítány ze získaných křivek. Všechny experimenty byly opakovány čtyřikrát s maximální odchylkou 15 %. Vzhledem k omezené rozpustnosti látek ve vodě, všechny testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a zředěny vodou na konečnou koncentraci DMSO 0,6%.

25

Pomocí tohoto testu bylo zjištěno, že žádná z testovaných látek: 1-(3-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (2) 1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (6), 1-(3-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (7), 1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (16), 1-((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (20), 1-(2-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (25), 1-(2-methoxy-1-methyl-

ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (28), 1-allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (50) 1-prop-2-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (51), 1-(2-chlor-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (65) a 1-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea (75) nebyla toxická pro lidské kožní fibroblasty, a to až do nejvyšší testované koncentrace 100 μ M. Záměrně byly vybrány neaktivnější látky, u kterých se předpokládá praktické využití v zemědělství a s nimiž mohou lidé přijít do styku při manipulaci.

Příklad 14

Přípravky

Aktivní složkou v přípravcích může být kterákoliv sloučenina obecného vzorce I.

	a)	b)	c)	d)
A1. Emulgovatelné koncentráty				
Aktivní složka	5 %	10 %	25 %	50 %
dodecylbenzensulfonan vápenatý	6 %	8 %	6 %	8 %
polyoxyetylovaný ricinový olej (polyglykol ether ricinového oleje)	4 %	–	4 %	4 %
(36 mol ethylen oxid)				
oktylfenol polyglykol ether (7–8 mol ethylen oxid)	–	2 %	–	2 %
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.

	a)	b)	c)	d)
A2. Roztoky				
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	75 %	60 %	–	–
C_9 – C_{12}				

Roztoky jsou vhodné k aplikaci ve formě mikrokapek.

	a)	b)	c)	d)
A3. Smáčivé prášky				
Aktivní složka	5 %	25 %	50 %	80 %
ligninsulfonan 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 %
kaolin	87 %	61 %	37 %	–

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

	a)	b)	c)
A4. Potahované granule			
Aktivní složka	0,1 %	5 %	15 %
vysoce disperzní kyselina křemičitá	0,9 %	2 %	2 %

anorganický nosič (0,1 až 1 mm) např. CaCO ₃ nebo SiO ₂	99,0 %	93 %	83 %
---	--------	------	------

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

A5. Potahované granule	a)	b)	c)
Aktivní složka	0,1 %	5 %	15 %
polyethylenglykol MW 200	1,0 %	2 %	3 %
10 vysoce disperzní kyselina křemičitá	0,9 %	1 %	2 %
anorganický nosič (AE 0,1 až 1 mm) např. CaCO ₃ nebo SiO ₂	98,0 %	92 %	80 %

15 Jemně rozemletá aktivní složka je v mixéru stejnosměrně nanášena na nosič zvlhčený polyethylenglykolem. Takto jsou získány neprašné granule.

A6. Extrudované granule	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	0,1 %	3 %	5 %	15 %
ligninsulfonát sodný	1,5 %	2 %	3 %	4 %
20 karboxymethylcelulóza	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.

25 A7 Prachy	a)	b)	c)
Aktivní složka	0,1 %	1 %	5 %
talek	39,9 %	49 %	35 %
kaolin	60,0 %	50 %	60 %

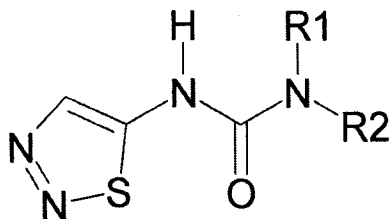
30 Prachy k přímému použití jsou získány rozemletím aktivní složky s nosičem ve vhodném mlýnu.

A8. Suspenzní koncentrát	a)	b)	c)	d)
Aktivní složka	3 %	10 %	25 %	50 %
ethylen glykol	5 %	5 %	5 %	5 %
35 nonylfenol polyglykol ether (15 mol ethylen oxid)	–	1 %	2 %	–
lignosulfonát sodný	3 %	3 %	4 %	5 %
karboxymethylcelulóza	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 %
40 voda	86 %	78 %	64 %	38 %

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

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. 1,2,3-thiadiazol-5-yl-deriváty močoviny obecného vzorce I



(I),

kde

10

R2 je vodík;

R1 je vybrán ze skupiny zahrnující

15 C₁-C₆ alkyl, substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

C₂-C₆ alkenyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

C₂-C₆ alkynyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

20 tetrahydrofuran-2-yl-methyl nebo tetrahydrofuran-3-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

25 thiofen-2-yl-methyl nebo thiofen-3-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

furan-2-yl-methyl nebo furan-3-yl-methyl substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

30 1,3-dioxolan-2-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

tetrahydropyran-2-yl-methyl, tetrahydropyran-3-yl-methyl nebo tetrahydropyran-4-yl-methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen;

35 (3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl)methyl, (3,4-dihydro-2H-pyran-3-yl)methyl, (3,4-dihydro-2H-pyran-4-yl)methyl, (3,4-dihydro-2H-pyran-5-yl)methyl nebo (3,4-dihydro-2H-pyran-6-yl)methyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen.

40 2. Deriváty podle nároku 1, kde je-li R1 alkyl, je tento alkyl substituovaný na terminálním atomu alespoň jednou skupinou vybranou ze skupin hydroxy, C₁-C₄ alkoxy, thio, C₁-C₄ alkylthio, kyano a halogen.

45 3. Deriváty podle nároku 1, kde R1 je vybrán ze skupiny zahrnující 3-hydroxy-propyl, 4-hydroxy-butyl, 5-hydroxy-pentyl, 6-hydroxy-hexyl, 2-methoxy-ethyl, 3-methoxy-propyl, 4-methoxy-butyl, 5-methoxy-pentyl, 6-methoxy-hexyl, 2-ethoxy-ethyl, 3-ethoxy-propyl, 4-

ethoxy-butyl, 5-ethoxy-pentyl, 6-ethoxy-hexyl, 2,2-dimethoxy-ethyl, 1,2-dimethoxy-ethyl, 1,2,2-trimethoxy-ethyl, 3,3-dimethoxy-propyl, (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl, (Z)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl, 3-methyl-but-2-enyl, isopentenyl, 2-hydroxy-propyl, 2-hydroxy-1-methyl-ethyl, 2-methoxy-propyl, 2-methoxy-1-methyl-ethyl, 3,3-dimethoxy-1-methyl-propyl, 3,3-dimethoxy-2-methyl-propyl, 2,3,3-trimethoxy-propyl, 4,4-dimethoxy-butyl, 3,4,4-trimethoxy-butyl, 2-thio-ethyl, 3-thio-propyl, 4-thio-butyl, 5-thio-pentyl, 6-thio-hexyl, 2-methylthio-ethyl, 3-methylthio-propyl, 4-methylthio-butyl, 5-methylthio-pentyl, 6-methylthio-hexyl, 2-ethylthio-ethyl, 3-ethylthio-propyl, 4-ethylthio-butyl, 5-ethylthio-pentyl, 6-ethylthio-hexyl, vinyl, allyl, but-3-enyl, pent-4-enyl, hex-5-enyl, ethynyl, prop-2-ynyl, but-3-ynyl, pent-4-ynyl, hex-5-ynyl, (Z)-buta-1,3-dienyl, (1Z,3E)-penta-1,3-dienyl, (E)-penta-2,4-dienyl, (1Z,3E)-hexa-1,3,5-trienyl, (2E,4E)-hexa-2,4-dienyl, (E)-hexa-3,5-dienyl, 2-chlor-ethyl, 3-chlor-propyl, 4-chlor-butyl, 5-chlor-pentyl, 6-chlor-hexyl, 2-brom-ethyl, 3-brom-propyl, 4-brom-butyl, 5-brom-pentyl, 6-brom-hexyl, tetrahydrofuran-2-yl-methyl, tetrahydrofuran-3-yl-methyl, thiofen-2-yl-methyl, (5-methyl-furan-2-yl)-methyl, 1,3-dioxolan-2-yl-methyl, tetrahydropyran-2-yl-methyl, 3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl-methyl, 4-hydroxy-3-methylbutyl, (Z)-1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl, (E)-1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl.

4. Deriváty podle nároku 1, kde sloučenina obecného vzorce I je vybrána ze skupiny zahrnující následující látky: 1-(2-hydroxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-hydroxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-hydroxy-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-hydroxy-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-methoxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-methoxy-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-methoxy-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-ethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-ethoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-ethoxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-ethoxy-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-ethoxy-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(1,2-dimethoxy-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-3-(1,2,2-trimethoxy-ethyl)-urea, 1-(3,3-dimethoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-methyl-but-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-hydroxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-hydroxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methoxy-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3,3-dimethoxy-1-methyl-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3,3-dimethoxy-2-methyl-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-3-(2,3,3-trimethoxy-propyl)-urea, 1-(4,4-Dimethoxy-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-[1,2,3]Thiadiazol-5-yl-3-(3,4,4-trimethoxy-butyl)-urea, 1-(2-thio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-thio-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-thio-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-thio-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-thio-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-methylthio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-methylthio-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-methylthio-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-methylthio-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-methylthio-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-ethylthio-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-ethylthio-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-ethylthio-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-ethylthio-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-ethylthio-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-vinyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-allyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-but-3-enyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-pent-4-enyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-hex-5-enyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-ethynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-prop-2-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-but-3-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-pent-4-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-hex-5-ynyl-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-hydroxy-3-methylbutyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-1'-methyl-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((Z)-buta-1,3-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((1Z,3E)-Penta-1,3-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-penta-2,4-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((1Z,3E)-hexa-1,3,5-trienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-

((2E,4E)-hexa-2,4-dienyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-((E)-hexa-3,5-dienyl)-3-[1,2,3]-thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-chlor-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-chlor-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-chlor-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-chlor-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-chlor-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(2-brom-ethyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3-brom-propyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(4-brom-butyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-brom-pentyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(6-brom-hexyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(tetrahydrofuran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(tetrahydrofuran-3-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(thiofen-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(5-methyl-furan-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(1,3-dioxolan-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(tetrahydropyran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea, 1-(3,4-dihydro-2H-pyran-2-yl-methyl)-3-[1,2,3]thiadiazol-5-yl-urea.

5. Použití derivátů podle kteréhokoliv z předcházejících nároků jako antistresových látek pro rostliny a/nebo pro inhibici senescence rostlin, rostlinných orgánů a/nebo rostlinných buněk.

6. Použití podle nároku 5, kde sloučeniny obecného vzorce I se použijí pro oddálení degradace chlorofylu a senescence rostlinných tkání a orgánů.

7. Použití podle nároku 5, kde sloučeniny obecného vzorce I se použijí jako inhibitory stresu a stresem indukované senescence v produkci plodin, zejména obilovin, cukrové řepy, malvic, peckovic a měkkého ovoce, luštěnin, olejnin, okurek, citrusového ovoce a zeleniny nebo rostlin, jako je tabák, ořechy, lilek, cukrová třtina, čaj, vinné hrozny, chmel, banány a přírodní kaučuk a léčivé rostliny, stejně jako okrasné rostliny.

8. Použití podle nároku 5, kde sloučeniny obecného vzorce I se použijí jako inhibitory stresu a stresem indukované senescence v produkci plodin, přičemž stresem je stres způsobený suchem nebo salinitou.

9. Anti-senescenční a/nebo antistresové přípravky na celé rostliny, rostlinné orgány a/nebo rostlinné buňky, **v y z n a č e n é t í m**, že obsahují alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I a alespoň jednu pomocnou látku.

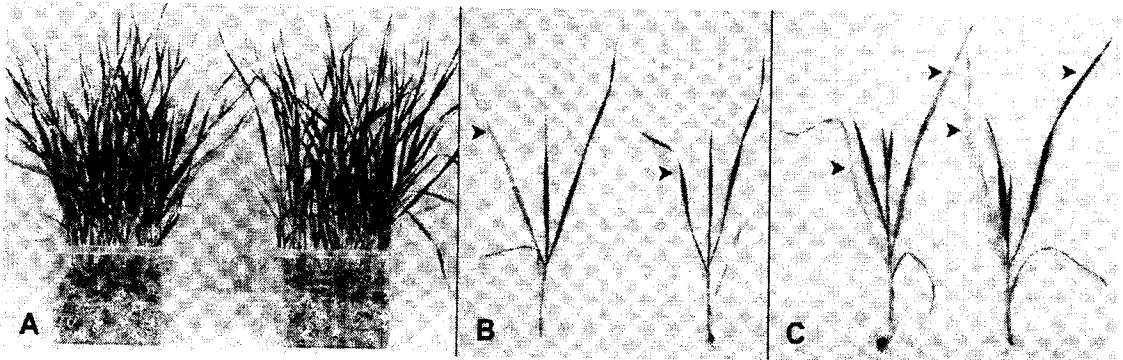
10. Způsob inhibice senescence a/nebo stresu v rostlinách, v rostlinných orgánech a/nebo v rostlinných buňkách, **v y z n a č e n ý t í m**, že zahrnuje aplikaci alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I, jak je definována v nároku 1.

11. Způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že z 1,2,3-thiadiazol-5-ylaminu a difosgenu se připraví 1,2,3-thiadiazol-5-yl-isokyanát, který se dále uvede do reakce s odpovídajícím aminem obecného vzorce R1R2NH, ve kterém jsou R1 a R2, jak je definováno v nároku 1.

45

I výkres

Obrázek 1



Konec dokumentu
